

**ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG
 γ -GLUTAMYLTRANSPEPTIDASE POSITIVER,
PRÄNEOPLASTISCHER RATTENLEBERZELLEN**

JÖRG LEBSANFT

ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG γ -GLUTAMYLTRANSPEPTIDASE
POSITIVER, PRÄNEOPLASTISCHER RATTENLEBERZELLEN

DISSERTATION
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Jörg Lebsanft
aus Stuttgart

1986

vorgelegt am: 28. April 1986

1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Hartmann
2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Fanning

Tag der mündlichen Prüfung: 04. Juli 1986

In dieser Arbeit verwendete Abkürzungen

2-AAF	2-Acetylaminofluoren
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNase	Desoxyribonuclease
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
y-GT	y-Glutamyltranspeptidase
HEPES	4-(2-Hydroxyäthyl)-1-Piperazinäthansulfonsäure
I.E.	Internationale Einheit
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PVP	Polyvinylpyrrolidon
TES	2-[[2-Hydroxy-1,1-Bis(Hydroxymethyl)äthyl]-Amino]- 1-Propansulfonsäure



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. MATERIAL	7
2.1. Tiere	7
2.2. Chemikalien und Enzyme	7
2.3. Medien und Lösungen	9
2. METHODEN	12
3.1. Proteinbestimmungen	12
3.2. Aktivitätsbestimmung der γ -GT	14
3.3. Isolierung der γ -GT aus Rattennieren	15
3.4. SDS-Gelelektrophorese	17
3.5. Gewinnung und Charakterisierung eines Antiserums gegen γ -GT	19
3.5.1. Immunisierung der Kaninchen	19
3.5.2. Entbluten der Kaninchen	20
3.5.3. Passiver Hämagglutinationstest	21
3.5.4. Titerbestimmung durch Ausfällung des Antigens	22
3.5.5. Ouchterlony Doppeldiffusionsmethode	22
3.6. Beschichtung der Petrischalen	23
3.6.1. Beschichtung mit Antikörpern	23
3.6.2. Bestimmung der Menge gebundenen Antikörpers	24
3.6.3. Beschichtung mit Kollagen	25
3.7. Isolierung der Leberzellen	26
3.8. Isolierung γ -GT positiver Hepatozyten	27
3.9. Bestimmung des Anteils γ -GT positiver Hepatozyten	28
3.10. Bestimmung der Aktivität Fremdstoff-metabolisierender Enzyme	30
3.10.1. Benz(a)pyrenhydroxylase	30
3.10.2. Aldrinepoxidase	32
3.10.3. Ethoxyresorufindeethylase	33

	Seite
3.10.4. UDP-Glucuronosyltransferase	35
3.10.5. Epoxidhydrolase	36
3.11. Bestimmung der Taurocholataufnahme	37
3.12. Kultivierung der Leberzellen	40
3.13. Bestimmung des [³ H]Thymidineinbaus in die DNA	41
3.14. Autoradiographie	43
4. ERGEBNISSE	45
4.1. Herstellung von polyklonalen Antikörpern gegen y-Glutamyltranspeptidase	45
4.1.1. Isolierung der y-Glutamyltranspeptidase	46
4.1.2. Charakterisierung des Anti-y-GT Antiserums	46
4.2. Bestimmung des Anteils y-GT positiver Zellen einer Hepatozytensuspension	50
4.3. Trennung y-GT positiver und negativer Hepatozyten	50
4.3.1. Beschichtung von Petrischalen mit Antikörpern	51
4.3.2. Optimierung der Zelltrennung	53
4.3.2.1. Temperaturabhängigkeit der Anheftung	57
4.3.2.2. Abhängigkeit der Anheftung von der inkubierten Zellzahl	59
4.3.2.3. Beeinflussung der Zelltrennung durch verschiedene Kollagenasechargen	59
4.3.3. Abhängigkeit der Anheftungszeit der Hepatozyten von der Perfusionszeit der Leber mit Kollagenase	63
4.4. Aktivitäten Fremdstoff-metabolisierender Enzyme	64
4.5. Taurocholataufnahme in y-GT positive und negative Hepatozyten	71
4.6. Stimulierbarkeit der DNA-Synthese in getrennt kultivierten, y-GT positiven und negativen Hepatozyten durch die Hormone EGF, Insulin und Glucagon	76
5. DISKUSSION	80
6. ZUSAMMENFASSUNG	90
7. LITERATUR	93

1. Einleitung

Der Prozess der chemischen Kanzerogenese verläuft nach heutigen Erkenntnissen in mehreren, aufeinanderfolgenden Phasen. Weitgehend durchgesetzt hat sich die Einteilung der Tumorentstehung in Initiation, Promotion und Progression (Potter, 1983; Scherer, 1984; Farber, 1984a; Schulte-Hermann, 1985). Der erste Schritt, die Initiation, beinhaltet als wichtigstes Ereignis die Entstehung einer Mutation (Genmutation, Translokation oder Amplifikation). Durch die Wechselwirkung eines reaktionsfähigen Elektrophils oder Radikals mit der DNA (Miller & Miller, 1977) kommt es zu einer DNA-Veränderung. Für die Initiation ist es notwendig, daß sich die Zelle anschließend teilt (Cayama et al., 1978; Pitot & Sirica, 1980; Columbano et al., 1981). Die genaue Funktion der Zellproliferation ist nicht geklärt; es wird angenommen, daß die DNA-Veränderung während der Replikation als Mutation fixiert wird. Die zweite Phase, die Promotion, ist gekennzeichnet durch die klonale Vermehrung der initiierten Zelle und die Expression eines atypischen Phänotyps (Hennings et al., 1983; Potter, 1984; Scherer, 1984). Bei der Leber können zunächst focale Leberzellpopulationen, sog. prä-neoplastische Foci (Inseln), später hyperplastische Noduli nachgewiesen werden. Der Begriff Progression beschreibt schließlich den Übergang der prä-neoplastischen zur malignen, neoplastischen Zelle.

Je nach Wirksamkeit in den verschiedenen Stufen der Kanzerogenese unterscheidet man zwischen initiiierenden und promovierenden Substanzen. Die Umwandlung zur malignen Zelle - die Progression - wird wahrscheinlich ebenfalls durch initiiierende Substanzen bewirkt (Hennings et al., 1983; Potter, 1984; Scherer, 1984). Chemische Verbindungen, deren alleinige Anwendung zu einer erhöhten Tumorbildung führt, vereinigen initiiierende

und promovierende Eigenschaften und werden als komplette Kanzerogene bezeichnet (Schulte-Hermann, 1985).

Wesentliche Erkenntnisse zur Entstehung von Tumoren wurden am Modell der Leber erhalten. Bei diesem Organ können präneoplastische Foci aufgrund ihrer veränderten Enzymaktivitäten enzymhistochemisch nachgewiesen werden. Einige der am häufigsten beobachteten Aktivitätsänderungen sind der Verlust von Adenosintriphosphatase (Börner & Gössner, 1968) und Glucose-6-Phosphatase (Gössner & Friedrich-Frekza, 1964) sowie die Expression der normalerweise in Hepatozyten nicht nachweisbaren γ -Glutamyltranspeptidase (γ -GT) (Kalengayi et al., 1975).

Eine besondere Bedeutung für die Tumorentstehung besitzen die Fremdstoff-metabolisierenden Enzyme, da die meisten Hepatokanzerogene reaktionsträge sind und erst durch Cytochrom P-450 abhängige Monooxygenasen in die reaktive, ultimal kanzerogene Form überführt werden (Guengerich & Liebler, 1985). Diese Metaboliten üben durch Reaktion mit zellulären Makromolekülen ihre zytotoxische oder mutagene und damit initiierende Wirkung aus. Vorwiegend entgiftend wirken hingegen UDP-Glucuronosyltransferase und Epoxidhydrolase, indem sie die entstandenen, reaktiven Metaboliten inaktivieren (Greim et al., 1984).

Die Aktivitäten Cytochrom P-450 abhängiger Monooxygenasen sind in Zellen hyperplastischer Noduli vermindert, während die Aktivitäten von UDP-Glucuronosyltransferase und Epoxidhydrolase erhöht sind (Okita et al., 1976; Bock et al., 1982; Aström et al., 1983; Batt et al., 1984; Farber, 1984b). Diese Aktivitätsänderungen bewirken nach Meinung von Farber (1984b) eine höhere Resistenz der Zellen gegenüber Hepatokanzerogenen. Über die Aktivitäten der Fremdstoff-metabolisierenden Enzyme in den Vorläufern der Noduli, den präneoplastischen Foci, ist noch wenig bekannt. In diesem Zusammenhang wird von verschiedenen Autoren vermutet (Aström et al., 1983; Farber, 1984b), daß die tumorpro-

movierende Wirkung von Hepatokanzerogenen auf einen unterschiedlichen Metabolismus dieser Substanzen in Hepatozyten prä-neoplastischer Foci und umliegenden Zellen zurückzuführen sein könnte:

Die, durch Aktivierung entstehenden reaktiven Metaboliten führen zu Zellnekrosen, deren Folge ein Proliferationsstimulus ist. Aufgrund der zytotoxischen Wirkung dieser Metaboliten ist die Zellteilung der Hepatozyten jedoch gehemmt. Wären die Aktivitäten der Fremdstoff-metabolisierenden Enzyme in präneoplastischen Foci ähnlich wie in Noduli verändert, so könnte sich die frühe, präneoplastische Zelle in Folge des Proliferationsstimulus teilen, da sie weitgehend resistent gegenüber dem Hepatokanzerogen ist.

Möglicherweise ist dies die Ursache für den selektiven Wachstumsvorteil präneoplastischer Zellen gegenüber 'normalen Hepatozyten' (tumorpromovierender Effekt) unter dem Einfluß von Hepatokanzerogenen.

Auch gegenüber Phalloidin, einem Toxin aus *Amanita phalloides*, weisen γ -GT positive, präneoplastische Hepatozyten eine verminderte Empfindlichkeit auf (Sawada et al., 1982). Die Ursache hierfür kann jedoch nicht eine verminderte Aktivität Cytochrom P-450 abhängiger Monooxygenasen sein, da Phalloidin nicht aktiviert werden muß, um seine toxische Wirkung auf die Zelle ausüben zu können (Puchinger & Wieland, 1969; Frimmer, 1982). Das einzige Organ, das durch Phalloidin geschädigt wird, ist die Leber. Ursache für diese Organspezifität ist vermutlich, daß ausschließlich Hepatozyten Phalloidin aufnehmen können (Frimmer, 1982). Phalloidin wird aktiv über den Gallensäurecarrier, der auch Taurocholat transportiert, in die Leberzelle aufgenommen (Ziegler et al., 1980; Wieland et al., 1984). Eine verminderte Aktivität des Gallensäurecarriers korreliert daher gut mit einer erhöhten Toleranz gegenüber Phalloidin, wie

an Hepatozyten mit eingeschränkter Gallensäureaufnahme nachgewiesen wurde (Ziegler et al., 1979). Es ist jedoch nicht geklärt, ob der reduzierten Phalloidintoxizität für präneoplastische Zellen ebenfalls eine verminderte Aktivität des Gallensäurecarriers zugrunde liegt.

Eine der charakteristischen Eigenschaften von Tumorzellen ist der Verlust der Wachstumskontrolle. Bereits Hepatozyten aus präneoplastischen Foci weisen eine höhere Mitoserate als die umliegenden Zellen auf (Pugh & Goldfarb, 1978; Schulte-Hermann et al., 1981). Dieser Befund deutet auf eine frühe Veränderung der Wachstumskontrolle im Prozess der Kanzerogenese hin. Dennoch verändert sich die Zahl der präneoplastischen Zellen der Leber nur geringfügig, da in den Foci die Absterberate der Hepatozyten (Apoptose) erhöht ist (Bursch et al., 1984). Die Ursache für die erhöhte Proliferation präneoplastischer Hepatozyten ist unbekannt. Möglicherweise reagieren präneoplastische Leberzellen sensitiver auf Faktoren, welche die Zellteilung der Hepatozyten induzieren. Der Nachweis, daß lösliche Faktoren, die im Blut zirkulieren, die Proliferation von Hepatozyten stimulieren, gelang durch Verbindung der Blutkreisläufe zweier Ratten (Moolten & Bucher, 1967; Sakai, 1970; Fisher et al., 1971). Wurde bei einem der Tiere eine partielle Hepatektomie durchgeführt, so fand auch in der intakten Leber des anderen eine verstärkte Zellteilung statt. Bei Versuchen, die zur Identifizierung der Wachstumsfaktoren durchgeführt wurden, ergab sich eine stimulierende Wirkung von EGF (epidermaler Wachstumsfaktor) auf den [³H]Thymidineinbau in die DNA der Leber, die bei gleichzeitiger Gabe von Insulin (Bucher et al., 1978) besonders ausgeprägt war. Da jede äußere Hormonzufuhr eine Reihe endogen regulierter Hormonblutspiegel beeinflusst, ergeben sich häufig Schwierigkeiten bei der Interpretation von in vivo Experimenten. Eine Möglichkeit, in vivo beobachtete Hormonwirkungen

auf bestimmte Organe oder Zellen zu überprüfen, ist die Bestätigung der Wirkung an den isolierten Zellen, die unter definierten Bedingungen kultiviert werden.

Auch bei kultivierten Hepatozyten konnte die DNA-Synthese durch Hormone stimuliert werden, eine Kombination der Hormone EGF, Insulin und Glucagon erwies sich dabei als besonders guter Stimulator (Richman et al., 1976; Friedman et al., 1981; McGowan et al, 1981; Hayashi & Carr, 1984). Unbekannt ist, ob die erhöhte Proliferation präneoplastischer Hepatozyten darauf zurückzuführen ist, daß diese Zellen sensitiver auf einen Teilungsstimulus von EGF, Insulin und Glucagon reagieren.

Um ein besseres Verständnis der Tumorentstehung in der Leber zu erhalten, ist die Charakterisierung früher Stadien präneoplastischer Zellen erforderlich. Für viele Untersuchungen ist die Isolierung intakter Hepatozyten aus präneoplastischen Foci nötig. Kürzlich beschrieben Hanigan & Pitot (1982) ein Verfahren, mit dem Hepatozyten γ -GT positiver Foci zum ersten Mal isoliert werden konnten. Entscheidend für die Isolierung ist die Lokalisation der γ -GT auf der äußeren Oberfläche der Zellmembran (Inoue et al., 1977; Horiuchi et al., 1978). Im ersten Schritt wurden die Hepatozyten durch Kollagenaseperfusion von Rattenlebern dissoziiert, anschließend γ -GT positive und negative Hepatozyten getrennt. Die Trennung erfolgte durch Inkubation der Zellsuspensionen auf Anti- γ -GT Antikörper-beschichteten Petrischalen. Hepatozyten, die sich an die Petrischalen hefteten, waren überwiegend γ -GT positiv. Über weiterführende Experimente mit isolierten γ -GT positiven Hepatozyten wurde bisher nicht berichtet. Möglicherweise bereitet die Trennung der Hepatozyten nach der Methode von Hanigan & Pitot noch erhebliche experimentelle Schwierigkeiten.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Verfahren von Hani-
gan & Pitot zur Trennung γ -GT positiver und negativer Hepato-
zyten zu überprüfen und, soweit erforderlich, zu optimieren.
Anschließend sollten die Eigenschaften γ -GT positiver und nega-
tiver Hepatozyten hinsichtlich folgender Parameter verglichen
werden:

1. Aktivität Fremdstoff-metabolisierender Enzyme. Eine vermin-
derte Aktivierung von Hepatokanzerogenen in γ -GT positiven
Hepatozyten bei besserer Inaktivierung der entstehenden,
reaktionsfähigen Metaboliten würde eine Erklärung für die
tumorpromovierende Eigenschaft dieser Substanzen geben.
2. Aufnahme von Taurochololat. Eine veränderte Aktivität des le-
berspezifischen Carriersystems für Taurochololat läßt Rück-
schlüsse auf den Differenzierungsgrad der präneoplastischen
Hepatozyten zu. Eine verminderte Taurochololataufnahme würde
außerdem die erhöhte Toleranz γ -GT positiver Hepatozyten ge-
genüber Phalloidin erklären.
3. Stimulierbarkeit der DNA-Synthese kultivierter Hepatozyten
durch die Hormone EGF, Insulin und Glucagon. Eine erhöhte
DNA-Synthese in γ -GT positiven Hepatozyten in Anwesenheit
dieser Hormone wäre ein wichtiger Hinweis auf die Ursachen
der veränderten Wachstumskontrolle präneoplastischer Hepato-
zyten.

2. Material

2.1. Tiere

Die Nieren, aus denen die γ -GT isoliert wurde, stammten aus Wistar und Sprague-Dawley Ratten beiderlei Geschlechts.

Präneoplastische Foci in Rattenlebern wurden induziert, indem 6 Wochen alten, männlichen Wistarratten 0.02% 2-Acetylaminofluoren für 9 Wochen zum Standardfutter (Altromin, Lage) zugesetzt wurde. Bevor die Hepatozyten aus den Lebern der Ratten isoliert wurden, erhielten die Tiere noch 2-9 Wochen das Standardfutter ohne 2-AAF.

2.2 Chemikalien und Enzyme

Atlas Chemie, Essen

Brij-58

Amersham Buchler, Braunschweig

[^3H]Thymidin, [^{14}C]Taurocholat

Biochrom, Berlin

Penicillin, Streptomycin

Bio-Rad, München

Acrylamid, Bisacrylamid, Ammoniumpersulfat, Tetramethyl-
äthyldiamin

Collaborative Research Inc., Lexington, MA. USA

Epidermaler Wachstumsfaktor

Carcinogenesis Standard Reference Compound Bank, NCI Bethesda,
Md. USA

3-Hydroxybenz(a)pyren

Molecular Probes Inc. Junction City, Oreg. USA

Ethoxyresorufin, Resorufin

MSD Sharp & Dohme, München

Dexamethasonphosphat

New England Nuclear Research Products, Dreieich

[Carboxyl-¹⁴C]Dextran

Riedel de Haen, Hannover

Aldrin, Dieldrin

Roth, Karlsruhe

Benz(a)pyren

Sigma, Deisenhofen

Insulin (Rinderpankreas, 24 I.E./mg), Glucagon

Worthington Biochem. Corp. Freehold, N.J. USA

Kollagenase (Typ CLS II)

[¹⁴C]Styrolepoxid wurde freundlicherweise von Prof. Oesch,
Mainz, zur Verfügung gestellt.

Alle anderen Chemikalien und Enzyme wurden von den Firmen
Boehringer (Mannheim), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg)
und Sigma (Deisenhofen) bezogen.

2.3. Medien und Lösungen

1. Phosphat-gepufferte Salzlösung (pH 7.4) (PBS)

Komponente	Konzentration	Komponente	Konzentration
	[mM]		[mM]
NaCl	137	KH_2PO_4	1.5
KCl	2.7	MgCl_2	0.49
Na_2HPO_4	6.5	CaCl_2	0.9

Das CaCl_2 wurde getrennt in aqua bidest. gelöst und als letzte Komponente zugesetzt.

2. Perfusionsmedium (pH 7.4)

Komponente	Konzentration	Komponente	Konzentration
	[mM]		[mM]
NaCl	130	D-Glucose	5.0
KCl	5.6	L-Lactat	1.5
NaH_2PO_4	1.0	L-Pyruvat	0.15
NaHCO_3	25	Streptomycin	100 mg/l
MgSO_4	1.0	Penicillin	10^5 E/l

3. DMEM-Medium (modifiziert)

Käuflichem DMEM-Medium (Serva, Heidelberg) wurde HEPES (10 mM) und TES (10 mM) zugesetzt und der pH-Wert auf 7.4 eingestellt.

4. Trennmedium (pH7.4)

Komponente	Konzentration	Komponente	Konzentration
	[mM]		[mM]
NaCl	133	D-Glucose	5.6
KCl	5.4	CaCl ₂	1.4
Na ₂ HPO ₄	5.0	MgCl ₂	1.0
HEPES	20	Phenolrot	10 mg/ml

Dem Medium wurden außerdem Konzentrate (je 10 ml/l) von MEM Aminosäuren, MEM nicht essentielle Aminosäuren, L-Glutamin und MEM Vitaminen der Firma Serva, Heidelberg zugesetzt. Das CaCl₂ wurde getrennt in aqua bidest. gelöst und als letzte Komponente zugefügt. Vor Gebrauch setzte man dem Medium DNase, (100 µg/ml) zu.

5. Transportmedium (pH 7.4)

Komponente	Konzentration	Komponente	Konzentration
	[mM]		[mM]
NaCl	132	MgSO ₄	0.85
KCl	5.2	CaCl ₂	0.81
HEPES	15	Glucose	10
NaH ₂ PO ₄	3.0		

Das CaCl₂ wurde getrennt in aqua bidest. gelöst und als letzte Komponente zugesetzt.

6. Kulturmedium (pH 7.4)

Komponente	Konzentration
------------	---------------

Anorganische Salze [mM]

NaCl	100
KCl	5.6
Na ₂ HPO ₄	1.6
KH ₂ PO ₄	0.5
NaHCO ₃	25
MgSO ₄	1.7
CaCl ₂	2.0

Aminosäuren

L-Alanin	1.0
L-Asparagin	0.17
L-Asparaginsäure	0.2
L-Cystein x HCl	0.25
L-Glutamin	2.0
L-Glutaminsäure	1.0
L-Glycin	0.7
L-Histidin x HCl	0.4
L-Ornithin x HCl	0.3
L-Leucin	0.38
L-Lysin x HCl	1.42
L-Methionin	0.33
L-Isoleucin	0.19
L-Phenylalanin	0.3
L-Prolin	0.43
L-Serin	0.4
L-Threonin	0.63
L-Tryptophan	0.2
L-Tyrosin	0.22
L-Valin	0.55

Puffer und Antibiot. [mM]

HEPES	10
TES	10
Gentamicin	50 mg/l

Komponente	Konzentration
------------	---------------

Vitamine [/µM]

L-Ascorbisäure	300
d-Biotin	0.1
Ca-D-Pantothenat	2.0
Folsäure	1.4
Nicotinamid	50
Pyridoxin-HCl	5.0
Riboflavin	3.0
Thiamin-HCl	30
Retinsäure	0.5
Tocopherolacetat	4.2
Vitamin B ₁₂	0.6
Menadion, Bisulfit	0.04

Weitere Zusätze [mM]

Carnitin	1.0
Cholinchlorid	0.2
Ethanolamin	0.01
D-Fructose	0.1
d-Galactose	4.0
D-Glucose	6.0
myo-Inositol	0.03
L-Lactat	0.81
L-Pyruvat	0.08
Rinderserumalbumin	5 g/l
Oleat	0.5

Spurenelemente [/µM]

CuSO ₄	0.005
ZnSO ₄	1.5
FeSO ₄	1.0
MnCl ₂	0.0004
H ₂ SeO ₃	0.06
NH ₄ VO ₃	0.005
CrCl ₃	0.05
Ni(NO ₃) ₂	0.001

3. Methoden

3.1. Proteinbestimmungen

Methode von Lowry et al. (1951), modifiziert nach Peterson (1977).

Für die Bestimmung des Proteingehalts von Hepatozytensuspensionen wurden die Proben 3 sec mit Ultraschall (Branson-Sonifier, Modell B-12) homogenisiert.

Reagenz A: 50 ml einer 20%igen Na_2CO_3 -Lösung (w/v) wurden langsam unter Rühren zu 50 ml einer Lösung, die 0.2% $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$ und 0.4% Kaliumnatriumtartrat enthielt, gegeben. Das Reagenz A wurde aus gleichen Volumenanteilen dieser Lösung, aqua bidest., 10%iger Natriumdodecylsulfat-Lösung (w/v) und 0.8 N NaOH unmittelbar vor Gebrauch hergestellt.

Reagenz B: 1 Volumenanteil Folin-Ciocalteus Phenolreagenz, 5 Teile aqua bidest.

Durchführung

- 100,ul Probe
- + 10,ul 0.15%ige Natriumdesoxycholat-Lösung, mischen und 10 min bei Raumtemperatur stehen lassen.
- + 10,ul 72%ige Trichloressigsäure, mischen und 15 min in einer Eppendorfzentrifuge (No. 5412) zentrifugieren. Überstand möglichst vollständig absaugen.
- + 200,ul aqua bidest.
- + 200,ul Reagenz A, mischen und 10 min bei Raumtemperatur stehen lassen.
- + 100,ul Reagenz B

Nach 30 min wurde die Extinktion bei 750 nm gemessen. Aus den Extinktionswerten wurde der Proteingehalt durch Vergleich mit der Eichkurve (2-40 μ g Rinderserumalbumin/Testansatz) ermittelt.

Bio-Rad Proteinbestimmung

Bei den Experimenten zur Taurocholataufnahme war es nötig, die Proteingehalte der einzelnen Zellfraktionen möglichst rasch zu ermitteln. Hier bietet sich die Bio-Rad Proteinbestimmung, deren Prinzip auf der Veränderung des Absorptionsmaximums von Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bradford, 1976) beruht, an.

Durchführung

800 μ l Probe (3 sec mit Ultraschall homogenisiert)
+ 200 μ l 'Bio-Rad dye reagent concentrate' (vor Gebrauch
filtriert), mischen.

Nach 5-10 min wurde die Extinktion bei 595 nm gemessen. Aus den Extinktionswerten wurde der Proteingehalt mit Hilfe einer Eichkurve (1-40 μ g Rinder γ -Globulin) ermittelt.

3.2. Aktivitätsbestimmung der γ -GT

Prinzip

L- γ -Glutamyl-p-Nitroanilid + Glycylglycin $\xrightarrow{\gamma\text{-Gt}}$
 γ -Glutamyl-glycylglycid + p-Nitroanilin

Es wird die Extinktion des entstehenden p-Nitroanilins bestimmt.

Durchführung (modifiziert nach Szasz, 1970)

Substratlösung: 52.5 mM Glycylglycin, 10.5 mM MgCl_2 , 2.63 mM γ -Glutamyl-p-nitroanilid in 0.05 M Trispuffer (pH 8.0). Die Substratlösung wurde bei 25°C vorinkubiert.

Inkubationsansatz (in der Küvette bei 25°C):

	<u>Konz. im Test</u>
1 ml Substratlösung	50 mM Glycylglycin
	10 mM MgCl_2
	2.5 mM γ -Glutamyl-
	p-nitroanilid
	48 mM Tris

Die Reaktion wurde mit 50 μ l Probe gestartet.

Die Extinktionsänderung bei 405 nm wurde kontinuierlich aufgezeichnet (Perkin Elmer Spektralphotometer No. 555). Die Berechnung erfolgte nach Szasz (1970):

Volumenaktivität in der Probe (U/ml) = $2.12 \times \Delta E/\text{min}$

3.3. Isolierung der γ -Glutamyltranspeptidase aus Rattennieren

Prinzip

Die γ -Glutamyltranspeptidase wurde, wie von Tsuchida et al. (1979) beschrieben, nach einer Modifikation der Methode von Tate und Meister (1975) aus Rattennieren gereinigt. Aus dem 100000 g Sediment wird das membrangebundene Enzym erst mit Triton-X-100, dann mit Natriumdesoxycholat extrahiert und anschließend mit Ammoniumsulfat (50% Sättigung) gefällt. Durch Zugabe der Protease Bromelain findet eine partielle Proteolyse statt, die eine wasserlösliche, jedoch enzymatisch voll aktive Form der γ -GT hinterläßt. Eine Folge dieser Behandlung ist, daß das Enzym selbst bei 70%iger Ammoniumsulfatsättigung in Lösung bleibt. Anschließend wird die γ -GT säulenchromatographisch gereinigt; hierbei wird das Enzym hinsichtlich seiner Bindung an DEAE-Celulose, dann gelchromatographisch auf Grund des Molekulargewichts von Verunreinigungen abgetrennt.

Durchführung

130 g Rattennieren wurden in 520 ml 10 mM Tris-HCl Puffer, 0.15 M NaCl (pH 8.0) unter Eiskühlung mit einem Ultraturrax (Janke & Kunkel Typ TP 18-D) homogenisiert und anschließend 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach 1 h Zentrifugation bei 37000 Upm (Beckman, 45 Ti Rotor) wurde das Sediment mit 300 ml des gleichen Puffers gewaschen (Zentrifugation wie zuvor). Die Extraktion der membrangebundenen γ -Glutamyltranspeptidase aus dem Sediment erfolgte durch Homogenisieren (Potter Elvehjem Glashomogenisator) in 600 ml Trispuffer, der zusätzlich 0.5% Triton-X-100 enthielt. Nach zweistündigem Rühren bei Raumtemperatur wurde die Suspension 1 h bei 11600 Upm (Sorvall, SS 34 Rotor) zentrifugiert. Zum Überstand wurde Ammoniumsulfat bis zu einer Sättigung von 50% (31 g/100 ml) unter Rühren hinzugefügt,

1 h bei 4°C stehen gelassen und anschließend 30 min bei 15000 Upm (Sorvall, SS 34 Rotor) zentrifugiert. Das Sediment wurde in 300 ml 0.1 M Tris-HCl Puffer (pH 8.0) suspendiert, mit dem gleichen Volumen kaltem Aceton (-20°C) versetzt und 30 min bei 11600 Upm (SS 34 Rotor) zentrifugiert. Zum Sediment wurden 200 ml 0.1 M Tris-HCl Puffer (pH 8.0), der 1% Natriumdesoxycho-
lat enthielt, zugefügt, die Mischung erneut homogenisiert und anschließend 18 h bei 4°C gerührt. Nach 1 h Zentrifugation bei 11600 Upm wurde die γ -GT aus dem Überstand wie oben beschrieben mit Ammoniumsulfat (50% Sättigung) gefällt und abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 80 ml 0.05 M Kaliumphosphatpuffer (pH 7.5), der 1 mM EDTA enthielt, gelöst und 18 h gegen 5 l des gleichen Puffers dialysiert. Nach Zugabe von 2-Mercaptoäthanol [Endkonzentration 10 mM (70 μ l/100 ml)] wurde Bromelain (1 mg/10 mg Protein) zugesetzt und die Mischung 1 h bei 37°C im Abzug gerührt. Anschließend wurde die Suspension auf 4°C abgekühlt und Ammoniumsulfat bis zur 70 prozentigen Sättigung (47 g/100 ml) unter Rühren zugegeben. Nach 30 min Zentrifugation bei 15000 Upm wurde der Überstand 2 Tage bei 4°C gegen 5 l 0.01 M Kaliumphosphatpuffer (pH 7.5), der dreimal erneuert wurde, dialysiert. Das Dialysat wurde mit einer Flußgeschwindigkeit von 20 ml bei 4°C auf eine DEAE-Cellulose Säule aufgetragen (Whatman DE 52 microgranular, 1.6 x 10 cm, äquilibriert mit dem Kaliumphosphatpuffer). Das Enzym, das unter diesen Bedingungen nicht an DEAE-Cellulose bindet, wurde mit dem Auftragspuffer bei gleicher Flußgeschwindigkeit eluiert. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt, lyophilisiert (Leybold Heraeus GT 2 Lyophilisator), in 6 ml aqua bidest. gelöst und an einer Sephadex G-150 superfine Säule (2.6 x 90 cm) in aufsteigender Richtung bei 4°C chromatographiert. Äquilibrierungs- und Elutionspuffer war ein 0.1 M Trispuffer (pH 8.0), Auftrags- und Elutionsgeschwindigkeit betrugen 8 ml/h. Die Extinktion bei 280 nm wurde im Durchflußphotometer (Pharmacia dual path monitor UV 2) mit ange-

geschlossenem Schreiber (Pharmacia two channel recorder Rec 2) registriert und das Eluat in 4 ml Fraktionen mit einem automatischen Fraktionssammler (LKB Ultrorac 7000) aufgefangen. Nach Bestimmung der Volumenaktivität der γ -GT wurden die aktiven Fraktionen vereinigt.

3.4. SDS-Gelelektrophorese (modifiziert nach Laemmli und Favre, 1973)

Die Elektrophorese wurde in einer vertikalen Flachbettgelelektrophoreseapparatur (LKB 2001) bei 1.5 mm Geldicke durchgeführt.

Zusammensetzung des Trenngels (9% Acrylamid):

18 ml aqua bidest.

- + 3 ml 3 M Tris-HCl Puffer (pH 8.8)
- + 9 ml 30%ige Acrylamidlösung, 0.8% Bisacrylamid (w/v)
- + 0.3 ml 10%ige Natriumdodecylsulfatlösung (w/v)
- Lösung entgasen
- + 0.12 ml 10%ige Ammoniumpersulfatlösung (w/v)
- + 15 μ l N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin

Zusammensetzung des Sammelgels (4% Acrylamid):

7.55 ml aqua bidest.

- + 1 ml 0.5 M Tris-HCl Puffer (pH 6.8)
- + 1.3 ml 30%ige Acrylamidlösung, 0.8% Bisacrylamid (w/v)
- + 0.1 ml 10%ige Natriumdodecylsulfatlösung (w/v)
- Lösung entgasen
- + 40 μ l 10%ige Ammoniumpersulfatlösung (w/v)
- + 5 μ l N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin

Elektrodenpuffer:

15 g Tris, 72 g Glycin, 5 g Natriumdodecylsulfat auf 5 l mit aqua bidest. auffüllen, pH 8.8 einstellen.

Vorbereitung der Probe:

- 60 μ l γ -GT (50 μ g/60 μ l aqua bidest.)
- + 20 μ l 250 mM Tris-HCl Puffer, 1 M Saccharose,
8% Natriumdodecylsulfat (w/v) (pH 6.8)
Mischung 2 min in kochendes Wasser halten
- + 10 μ l 0.02% Bromphenolblau
- + 2 μ l Mercaptoäthanol

Nach dem Gießen der Gele (3/4 Trenngel, 1/4 Sammelgel) und dem Einfüllen der Elektrodenpuffer wurde die Probe aufgetragen und die elektrophoretische Trennung 5 h bei 15°C und einer konstanten Stromstärke von 20 mA durchgeführt. Anschließend wurden die Gele für 2 h in Fixierlösung (57 g Trichloressigsäure, 17 g Sulfosalicylsäure in einer Mischung aus 150 ml Methanol und 350 ml aqua bidest.) gelegt, dann über Nacht gefärbt [0.2% Coomassie Blue, 7% Essigsäure (v/v) in einer Mischung aus gleichen Teilen Methanol und aqua bidest.] und 2 Tage unter mehrmaligem Wechsel der Lösung (50 ml Methanol, 70 ml Essigsäure in 880 ml aqua bidest.) entfärbt.

3.5. Gewinnung und Charakterisierung eines Antiserums gegen y-GT

3.5.1. Immunisierung der Kaninchen

Vor jeder Injektion des Antigens wurde Blut zur Bestimmung des Antititers entnommen. Zur Blutentnahme wurden die Haare eines Ohrs mit der Schere vorsichtig entfernt, das Ohr mit 70%igem Alkohol kräftig abgerieben und eine Kanüle (Labomed LEM, 19G-1.10) mit angeschlossenem Schlauch und Spritze in die zentrale Arterie gegen den Blutstrom eingestochen. War die Arterie schlecht sichtbar, so konnte sie durch Reiben mit einem in Xylol getränkten Papiertuch zum Anschwellen gebracht werden. Ca. 5 ml Blut wurden nun langsam, ohne daß ein Unterdruck entstand, aufgezo-gen. Nach der Blutentnahme wurde das Ohr gründlich mit Wasser nachgespült, gewartet bis die Blutung zum Stillstand gekommen war und die Einstichstelle mit einer Fettcreme bestrichen.

Vor der Immunisierung wurde die lyophilisierte y-GT in aqua bidest. aufgenommen (Proteinkonzentration ca. 1 mg/ml) und über Nacht gegen 2 l PBS dialysiert. Für die erste Immunisierung wurden 300 µg y-GT in ca. 300 µl PBS mit dem gleichen Volumen Freund's complete Adjuvant durch mehrmaliges Aufsaugen und Ausdrücken durch eine Kanüle gemischt, bis man eine feindisperse Suspension erhielt. Diese Mischung wurde zu gleichen Teilen in die Muskulatur beider Oberschenkel des Kaninchens injiziert. Nach 4 und 5 Wochen wurden die Injektionen wiederholt, jedoch nur mit 150 µg y-GT pro Tier, ohne Freund's Adjuvant. Die dritte und letzte Boosterinjektion, nach insgesamt 6 Wochen, erfolgte in eine seitliche Ohrvene (150 µg y-GT).

3.5.2. Entbluten der Kaninchen

Eine Woche nach der letzten Boosterinjektion wurde das Kaninchen durch Injektion von 30 mg/kg Pentobarbital (Nembutal) in die Ohrvene narkotisiert. Auf der linken Seite des Halses wurden die Haare abrasiert und links von der Trachea die Haut mit einem Skalpell eingeschnitten. Man begann im oberen Drittel des Halses und führte den Schnitt kaudal bis zu einer Länge von ca 6 cm. Vorsichtig wurde die Fascia eingeschnitten und die Muskeln mit einer stumpfen Schere auseinandergedrückt, bis die Karotis, die rund und blaßrosa ist, erschien. Ein zusätzliches Erkennungsmerkmal ist der Karotissinusnerv, ein dicker weißer Nerv, der sich direkt an dem Gefäß entlangzieht. Die Karotis wurde bis zu einer Länge von ca. 4 cm freipräpariert und kopf- und herzwärts mit einer Gefäßklemme verschlossen. Eine weitere Gefäßklemme, die an dem anliegenden Nerv befestigt worden war, diente nach dem Durchschneiden der Arterie zum Halten des Karotisstumpfes. Nun wurde die herzwärts gelegene Klemme entfernt und das Blut (ca. 100 ml pro Tier) in einem Zentrifugenbecher aufgefangen. Die Gerinnung des Blutes erfolgte bei Raumtemperatur (1 h). Anschließend wurde das geronnene Blut 2 h im Kühlschrank (4°C) aufbewahrt, dann 10 min bei 2000 Upm (Heraeus Christ Zentrifuge 4123) zentrifugiert. Das Serum wurde abdekantiert und bei -80°C gelagert.

3.5.3. Passiver Hämagglutinationstest (modifiziert nach Avrameas & Ternynck, 1969)

Prinzip

Das Antigen wird mit Glutaraldehyd an Erythrozyten gekoppelt, und die beladenen Blutzellen mit steigenden Verdünnungen des Antiserums in Mikrotiterplatten gemischt. Im Falle einer positiven Reaktion werden die Erythrozyten durch den Antikörper vernetzt und bilden einen voluminösen Komplex, während sie bei negativer Reaktion auf den Boden des trichterförmigen Lochs absinken. Der Kehrwert der höchsten Serumverdünnung, bei der noch eine positive Reaktion stattfindet, wird als Titer bezeichnet.

Durchführung

Blutzellen aus 10 ml einer Mischung gleicher Teile Hammelblut und Alsever-Lösung (Seromed) wurden 3 Mal mit je 10 ml PBS gewaschen (Zentrifugation 5 min bei 2000 Upm Heraeus Christ Zentrifuge 4123). 250 μ l der gepackten Erythrozyten wurden zu 5 ml PBS, die 2.5 mg gereinigter γ -GT enthielten, hinzugefügt. Zu dieser Suspension wurden unter langsamem Rühren 0.75 ml einer 2.5%igen, wässrigen Glutaraldehydlösung gegeben, weitere 2 h gerührt, zentrifugiert (2000 Upm, 5 min), die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und in 5 ml PBS aufgenommen. 20 μ l dieser Suspension wurden mit 100 μ l Antiserum, aus dem eine Verdünnungsreihe in Mikrotiterplatten (Greiner, No. 651101) durch wiederholtes Verdünnen (1:1 mit 0.9% NaCl) hergestellt worden war, gemischt. Die Erythrozyten wurden durch Schütteln gleichmäßig suspendiert, über Nacht bei 4°C stehen gelassen und am nächsten Tag der Titer festgestellt.

3.5.4. Titerbestimmung durch Ausfällung des Antigens

Prinzip

Zu einem konstanten Volumen einer Verdünnungsreihe des Antiserums wird eine gleichbleibende Menge Antigen zugesetzt. Die dabei entstehenden Antigen-Antikörperkomplexe werden abzentrifugiert und die verbleibende Enzymaktivität im Überstand bestimmt.

Durchführung

Die Verdünnungsreihe in Eppendorfcups wurde erstellt, indem man 100 μ l Antiserum mit 100 μ l 0.9%iger NaCl-Lösung mischte, daraus 100 μ l entnahm, wiederum mit 0.9%iger NaCl-Lösung verdünnte und auf diese Weise fortfuhr, bis das Antiserum 12 Mal verdünnt worden war. Zu 100 μ l jedes Ansatzes wurden 100 μ l PBS, die 0.3 U γ -GT enthielten, zugefügt. Die Proben wurden gemischt, 30 min bei 37°C inkubiert, anschließend 1 h bei 4°C stehen gelassen. Nach 10 minütiger Zentrifugation in der Eppendorffzentrifuge wurde die Aktivität der γ -GT im Überstand bestimmt.

3.5.5. Ouchterlony Doppeldiffusionsmethode

Prinzip

Man läßt Antigen und Antikörper in einem Agargel gegeneinander diffundieren. An der Stelle optimaler Konzentrationsverhältnisse, entsteht eine Präzipitationslinie. Wurde mit einer Antigenpräparation, die mehrere Antigene enthielt, immunisiert, so bilden sich mehrere Linien.

Durchführung (modifiziert nach Ouchterlony, 1949)

Die Ouchterlony-Doppeldiffusionsmethode wurde mit Teilen eines LKB-Multiphorkitts für die Immunelektrophorese (No. 2117-401) durchgeführt.

Agargel

Zu 200 ml 0.1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7.2) wurden 3 g Agar zugegeben und die Mischung im kochenden Wasserbad erwärmt, bis sich der Agar gelöst hatte.

1 ml des heißen Gels wurde auf eine waagrechte Glasplatte gegossen und nach 30 min die Löcher ausgestanzt. In jedes Loch wurden 5 μ l Antigenlösung (ca. 5 μ g γ -GT) bzw. Antiserum gegeben, die Platten 24 h bei Raumtemperatur inkubiert (in wassergesättigter Atmosphäre) und anschließend 2 h in 0.9 %iger NaCl-Lösung und 30 min in aqua bidest. gespült. Nach dem Trocknen der Gele mit einem Föhn wurde mit Amidoschwarz (6 g Amidoschwarz in einer Mischung aus 450 ml Äthanol, 450 ml aqua bidest. und 100 ml Eisessig) 5 min gefärbt, anschließend das Gel mit der gleichen Lösung ohne Amidoschwarz entfärbt.

3.6. Beschichtung der Petrischalen

3.6.1. Beschichtung mit Antikörpern

Prinzip

Polystyrol adsorbiert geringe Mengen von Proteinen. Diese Eigenschaft, die man auch beim 'enzyme linked immunosorbent assay' ausnützt, ermöglicht es, mit geringem Aufwand eine große Menge Petrischalen zu beschichten.

Durchführung

20 ml Antiserum wurden mit Ammoniumsulfat (243 mg/ml, 40% Sättigung) versetzt, die Mischung 1 h auf Eis stehen gelassen und anschließend bei 15000 Upm (Sorvall, SS 34 Rotor) zentrifugiert. Das Sediment wurde einmal mit 20 ml Ammoniumsulfatlösung (40% Sättigung) gewaschen und in 10 ml Beschichtungspuffer aufgenommen. Der Beschichtungspuffer bestand aus 0.01 M Tris-HCl Puffer, 0.01 M NaCl, 0.01 M NaN_3 (pH 8.5) (Parsons, 1981). Gegen 3 l dieses Puffers wurde die Lösung 24 h dialysiert (nach 10 h Pufferwechsel). Die dialysierte Lösung wurde mit Beschichtungspuffer auf eine Proteinkonzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ eingestellt ($E_{280} = 0.138$, Hanigan & Pitot 1982). 5 ml dieser Antikörperlösung wurden in bakteriellen Petrischalen, Durchmesser 5 cm (Nunc No. 2-40045), über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und am nächsten Tag gegen 5 ml einer $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freien PBS, die 5% Rinderserumalbumin enthielt, ausgetauscht. Nach 1 h wurde die Lösung abgenommen, die Platten 3 Mal mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freier PBS gespült und bei -20°C bis zur Verwendung gelagert. Die Antikörperlösung kann mehrfach zur Beschichtung verwendet werden. Die beschichteten Petrischalen wurden durch Bestrahlung mit 8000 rad in einer ^{60}Co -Zelle sterilisiert, wenn die Hepatozyten nach der Trennung kultiviert werden sollten.

3.6.2. Bestimmung der Menge gebundenen Antikörpers

Prinzip

Die beschichteten Petrischalen werden mit einer Lösung gereinigter γ -GT inkubiert. Anschließend wird die Aktivität der gebundenen γ -GT gemessen.

Durchführung (modifiziert nach Hanigan & Pitot, 1982)

5 ml γ -GT (3 U/ml) in PBS wurden in jede Petrischale pipetiert und bei 25°C geschüttelt. Nach 90 min wurde die γ -GT Lösung abgenommen und die Petrischalen 4 Mal mit je 5 ml PBS nachgespült. Nach Zugabe von 2 ml Substratlösung (siehe Abschnitt 3.2.) wurden die Petrischalen 2 min geschüttelt, die Reaktion durch Zugabe von 4 ml 1.5 M Essigsäure gestoppt und die Extinktion der Lösung bei 405 nm im Photometer gemessen.

Berechnung der gebundenen γ -GT Aktivität (aus der Formel in Abschnitt 3.2. errechnet)

$$\text{Aktivität/Petrischale (U)} = \frac{2.12 \text{ U} \times \text{min} \times 0.05 \text{ ml} \times 6 \text{ ml}}{\text{ml} \times 2 \text{ min} \times 1.05 \text{ ml}} \times \Delta E_{405}$$

$$\Delta E_{405} = E_{405} \text{ beschichtete Platte} - E_{405} \text{ unbeschichtete Platte}$$

3.6.3. Beschichtung mit Kollagen (modifiziert nach Loofbourow et al., 1949; Gebhardt & Jung, 1982)

1.5 g Sehnenstränge aus Rattenschwänzen wurden durch Bestrahlung sterilisiert (8000 rad) und in der Kälte (4°C) unter sterilen Bedingungen bei ständigem Rühren wie folgt behandelt:

- | | |
|--|-----------|
| 1. Waschen mit je 400 ml 10%iger NaCl-Lösung | 3 x 1 Tag |
| 2. Waschen mit je 400 ml 0.067 M K_2HPO_4 -Lösung | 3 x 1 Tag |
| 3. Lipidextraktion mit je 100 ml Äther | 3 x 4 h |
| 4. Auflösen des Kollagens mit 125 ml 0.1%iger Essigsäure | 4 Tage |
| 5. Zugabe von 125 ml aqua bidest. | 4 Tage |
| 6. Zugabe von 375 ml aqua bidest. | 2 Tage |
- Zuletzt filtrierte man die Kollagenlösung durch Verbandmull.

Pro Petrischale [Falcon, 35 x 10 mm, Typ 3001 F ($[^3\text{H}]$ Thymidineinbau)] bzw. in jedes Loch einer Multiwellplatte (Lux, 8-Well Multiplate, 2.6 x 33 mm, No. 5218), das ein Deckplättchen (Lux, No. 5412, 24 x 30 mm) für die Autoradiographie enthielt, gab man 1 ml der Kollagenlösung und inkubierte 3 Tage bei 37°C im Brutschrank in wassergesättigter Atmosphäre. Anschließend wurde die Kollagenlösung abgesaugt und die Petrischalen dreimal mit PBS, die 10 mM HEPES enthielt (pH 7.4) gewaschen. Die Waschlösung wurde möglichst vollständig abgesaugt und die beschichteten Schalen bei 4°C gelagert.

3.7. Isolierung der Leberzellen (modifiziert nach Berry & Friend, 1969; Schwarz et al., 1980))

Die Ratte wurde durch eine i.p. Injektion von Nembutal (92 mg/kg) narkotisiert. Nach dem Öffnen des Abdomens wurde mit einer Braunüle (B. Braun, Nr. 1) die Pfortader kannuliert und mit Perfusionsmedium, dem 0.1 mM EDTA zugesetzt worden war, 4 min perfundiert. Anschließend wurde die Perfusion 4-6 min mit EDTA-freiem Medium fortgesetzt. Während der Perfusion wurde die Leber freipräpariert und anschließend im rezirkulierenden System mit 100 ml DMEM-Medium (modifiziert), das 100 U/ml Kollagenase enthielt, 15-35 min perfundiert. Die Perfusion wurde bei 37°C durchgeführt und die Medien kontinuierlich mit 95% Sauerstoff/5% CO₂ begast. Die Perfusionsgeschwindigkeit betrug 45 ml Medium/min. Die Leber wurde in ein flaches Glasgefäß, das DMEM-Medium enthielt, überführt, die Glisson'sche Kapsel mit einer Pinzette teilweise entfernt und die Hepatozyten durch vorsichtiges Schütteln der Leber separiert. Die Hepatozytensuspension wurde zunächst durch ein Netz mit 80 µm, dann mit 40 µm Porenweite filtriert und anschließend bei 250 Upm für 20 sec (Sorvall, SS 34 Rotor) zentrifugiert. Die sedimen-

tierten Zellen wurden in DMEM-Medium aufgenommen, der Waschvorgang zweimal wiederholt und die Hepatozytensuspension bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert (Zellkonzentration ca. 3×10^7 Hepatozyten/ml).

Die Zellvitalität wurde durch Färbung mit Trypanblau überprüft (Kruse & Patterson, 1975):

Trypanblaulösung: 0.4 g Trypanblau, 0.81 g NaCl, 0.06 g K_2HPO_4 , 0.05 g p-Hydroxybenzoat wurden in 100 ml aqua bidest. gelöst, aufgeköcht und der pH auf 7.3 eingestellt.

400 μ l Trypanblaulösung wurden mit 1.6 ml PBS und 50 μ l Zellsuspension versetzt, 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend der Anteil der angefärbten Zellen in einer Zählkammer bestimmt. Zellsuspensionen, bei denen sich über 20% der Zellen blau färbten, wurden verworfen.

3.8. Isolierung γ -GT positiver Hepatozyten

Standardverfahren

4×10^6 Hepatozyten in 100-200 μ l konzentrierter Zellsuspension wurden zu 5 ml Trennmedium, das auf 25°C vortemperiert worden war, gegeben, gleichmäßig suspendiert und in Antikörper-beschichteten Petrischalen auf einer thermostatisierten Platte (25°C) inkubiert. Nach 20 bis 60 min wurden die ungebundenen Zellen durch Schütteln resuspendiert, dekantiert und die Zellsuspension auf Eis gelagert. Die Petrischalen wurden 2 Mal vorsichtig mit je 5 ml PBS gespült und die gebundenen Zellen durch kräftiges Ausdrücken von 2.5 oder 5 ml PBS aus

einer 2-5 ml Finnpiquette losgelöst und in Kunststoffröhrchen überführt. Die Hepatozyten wurden durch Zentrifugieren bei 300 Upm (Heraeus Christ Zentrifuge 4123)) für 2 min konzentriert. Ungebundene, gebundene und ungetrennte Zellen wurden durch zweimaliges Waschen in das für den jeweiligen Versuch geeignete Medium transferiert und sofort weiterverwendet (Taurocholattransport, Zellkultur) oder bei -80°C eingefroren (Messung der Aktivität Fremdstoff-metabolisierender Enzyme).

3.9 Bestimmung des Anteils γ -GT positiver Hepatozyten (modifiziert nach Albert et al., 1961)

10-20 μl der Zellsuspension wurden auf einem Deckglas (Menzel-Gläser, 24 x 50 mm), das mit Entellan auf einen Objektträger geklebt worden war, ausgestrichen und mit einem Föhn ange trocknet. Die Objektträger wurden in eine 1%ige Celloidinlösung [Cedukol (Merck) in Äther/Aceton/Äthanol 30:40:30 gelöst] getaucht und wieder trockengeföhnt. Danach wurden sie bis zur Färbung bei 4°C aufbewahrt.

Färbung

Lösung A: 25 mg γ -L-Glutaminsäure-1-naphthylamid wurden in einer Mischung aus 0.3 ml N,N-Dimethylformamid und 0.3 ml 1 N NaOH gelöst und mit aqua bidest. auf 10 ml aufgefüllt.

Lösung B: 50 mg Fast Garnet GBC (Serva) und 50 mg Glycylglycin wurden in 190 ml 0.1 M Natriumacetatpuffer (pH 6.4) möglichst vollständig gelöst und die Lösung anschließend filtriert.

Die Objektträger wurden nacheinander wie folgt behandelt:

- | | |
|--|-----------|
| 1. Inkubation in der Mischung aus Lösung A und B (4°C) | 3.5 h |
| 2. Waschen in 0.1 M Natriumacetatpuffer | 3 x 1 min |
| 3. Eintauchen in 0.1 M CuSO_4 -Lösung | 2 min |
| 4. Fließend wässern (Leitungswasser) | 1 min |
| 5. Fixieren in 5%iger Glutaraldehydlösung, 5% Eisessig | 10 min |
| 6. Fließend wässern (Leitungswasser) | 5 min |
| 7. Spülen in aqua dest. | 1 min |

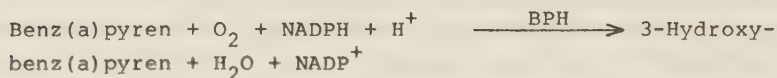
Nach dem Trocknen wurden die gefärbten Zellausstriche mit Glyceringelatine eingedeckt und der Anteil der γ -GT positiven (rotbraun gefärbten) Zellen durch Auszählen (mindestens 400 Zellen) ermittelt.

3.10. Bestimmung der Aktivität Fremdstoff-metabolisierender Enzyme

Die in PBS bei -80°C eingefrorenen Hepatozyten wurden aufgetaut und mit PBS auf die angegebene Proteinkonzentration verdünnt. Für jede Probe wurde eine Doppelbestimmung bei zwei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen (die zweite Probe wurde 1:1 mit PBS verdünnt) durchgeführt.

3.10.1. Benz(a)pyrenhydroxylase (BPH)

Prinzip



In Gegenwart von Leberzellhomogenaten und NADPH bilden sich aus Benz(a)pyren Phenole, wobei die Umsetzung zu 3-Hydroxybenz(a)pyren überwiegt. Eine weitgehende Trennung des unpolaren Benz(a)pyrens und der schwach sauren phenolischen Produkte ist aufgrund der unterschiedlichen Verteilungskoeffizienten in alkalisch-wässriger und organischer Phase möglich. Der Nachweis des 3-Hydroxybenz(a)pyrens beruht auf einem von den anderen phenolischen Produkten verschiedenen Emissions- und Exzitationsspektrum.

Durchführung (modifiziert nach Nebert & Gelboin, 1968;
Wiebel et al., 1977)

Substratlösung: 0.1 M Tris-HCl Puffer, 0.015 M $MgCl_2$ (pH 7.6)
vor Gebrauch: NADPH- Na_4 , 1 mg/ml zugesetzt.

Inkubationsansatz (in Plastikröhrchen im Gelblichtraum bei
37°C im Schüttelwasserbad):

Konz. im Test

500 μ l Substratlösung	50 mM Tris
	7.5 mM $MgCl_2$
	0.575 mM NADPH
+ 450 μ l Zellhomogenat (100-600 μ g Protein)	
Die Mischung wurde 5 min vorinkubiert und anschließend mit Benz(a)pyren (2 mM in Methanol) gestartet:	
+ 50 μ l Benz(a)pyren	0.1 mM BP

Nach 15 minütiger Inkubationszeit stoppte man die Reaktion:

+ 4 ml Propanol/Hexan, 1:3 (v/v), sofort gut mischen.

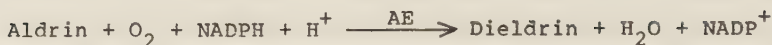
Nachdem sich die Phasen geklärt hatten, wurden aus der oberen Phase 2 ml abgenommen und in einem Flachbodenreagenzglas mit 1.75 ml 1 N NaOH gemischt. Da das Produkt alkalilabil ist, wurde spätestens nach 5 min im Fluorimeter (SA Jobin Yvon, Spektrofluor JY3D) gemessen.

Exzitation: 392 nm, Emission: 522 nm.

Die Volumenaktivität wurde mit Hilfe einer Eichkurve von 3-Hydroxybenz(a)pyren ermittelt.

3.10.2. Aldrinepoxidase (AE)

Prinzip



Dieldrin, das einzige Reaktionsprodukt, wird gaschromatographisch von Aldrin getrennt und quantitativ bestimmt.

Durchführung (modifiziert nach Wolff et al., 1979)

Substratlösung: 0.084 M Kaliumphosphatpuffer (pH 7.5)
vor Gebrauch zugesetzt: NADP-Na₂, 1.9 mg/ml;
Glucose-6-Phosphat-Na₂, 2.5 mg/ml; Glucose-6-
Phosphat-Dehydrogenase, 1.8 U/ml.

Inkubationsansatz (in 5 ml Glasröhrchen bei 37°C im Schüttelwasserbad):

Konz. im Test

95,ul Substratlösung	40 mM Phosphat
	1.1 mM NADP ⁺
	4 mM G6P
	0.84 U/ml G6P-DH
+ 100,ul Zellhomogenat (20-100,ug Prot.)	
Die Mischung wurde 5 min vorinkubiert und anschließend mit Aldrin (2 mM in Methanol) gestartet:	
+ 5,ul Aldrin (2 mM in Methanol)	50,um Aldrin

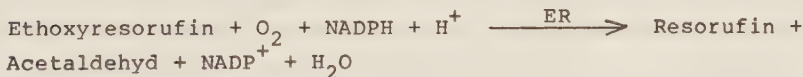
Nach 15 minütiger Inkubation stoppte man die Reaktion:

+ 1 ml n-Hexan, sofort geschüttelt (30 sec Vortex), dann auf Eis gestellt.

Zur Phasentrennung wurden die Proben 5 min bei 3500 Upm zentrifugiert (Christ junior Zentrifuge), die untere, wässrige Phase mit einer Pasteurpipette vollständig entfernt und verworfen, die organische Phase bis zur gaschromatographischen Analyse im Kühlschrank aufbewahrt. Die Dieldrinbestimmung erfolgte in einem Hewlett-Packard model 5750 G Gaschromatographen, der mit einem ^{63}Ni -electron-capture Detektor ausgerüstet war. Die Trennung wurde bei 210°C Säulentemperatur, 250°C Einlaßtemperatur mit Argon/Methan, 90:10 (40 ml/min) als Trägergas durchgeführt. Die Säule (1.8 m x 2 mm) enthielt 3% XE-60 auf Chromosorb-W (AW-DMCS), 80-100 mesh. 5 μl der Probe (in Hexan) wurden eingespritzt und die Peakhöhe des zweiten (Diel-drin) Peaks mit der eines Dieldrinstandards verglichen.

3.10.3. Ethoxyresorufindeethylase (ER)

Prinzip



Das sich bildende Resorufin wird fluorimetrisch bestimmt.

Durchführung (modifiziert nach Burke & Mayer, 1974;
Pohl & Fouts, 1980)

Substratlösung: 86 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7.8), 9 mM
MgSO₄, vor Gebrauch zugesetzt: NADPH-Na₄,
0.6 mg/ml

Inkubationsansatz (im 1.5 ml Eppendorfcup, 37°C im Schüttelwasserbad):

Konz. im Test

140 μ l Substratlösung	48 mM Phosphat 5 mM MgSO_4 0.4 mM NADPH
+ 100 μ l Zellhomogenat (25-100 μ g Protein) Die Mischung wurde 5 min vorinkubiert und anschließend mit Ethoxyresorufin (10 μ M in Methanol) gestartet:	
+ 10 μ l Ethoxyresorufin	0.4 μ M ER

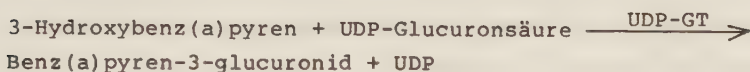
Nach 20 minütiger Inkubation stoppte man die Reaktion:
+ 0.5 ml Methanol

Das Gemisch wurde sofort auf einem Vortex-Mixer geschüttelt, weitere 10 min bei 37°C inkubiert, danach das gefällte Protein in einer Eppendorffzentrifuge 10 min lang abzentrifugiert. Die Fluoreszenz des klaren Überstands wurde in einer Küvette mit 0.5 cm Kantenlänge bestimmt.
Exzitation: 550 nm, Emission: 585 nm.

Die gebildete Menge Resorufin wurde durch Vergleich mit einer Resorufin-Eichgeraden ermittelt.

3.10.4. UDP-Glucuronosyltransferase (UDP-GT)

Prinzip



Das gebildete Glucuronid wird fluorimetrisch bestimmt. Produkt und Substrat werden differentiell extrahiert und besitzen außerdem unterschiedliche Fluoreszenzcharakteristik in alkalischer Lösung.

Durchführung (modifiziert nach Singh & Wiebel, 1979)

Reaktionspuffer: 0.5 M Tris-HCl Puffer, 25 mM MgCl₂, 0.01% Brij-58 (pH 7.5)

Inkubationsansatz (im Reagenzglas, Gelblichtraum, 37°C im Schüttelwasserbad):

	<u>Konz. im Test</u>
40 μ l Reaktionslösung	100 mM Tris
	5 mM MgCl ₂
	0.002% Brij-58
+ 100 μ l Zellhomogenat (10-30 μ g Protein)	
+ 50 μ l UDP-Glucuronat (12 mM)	3 mM UDP-Gluc.
Die Mischung wurde 5 min vorinkubiert und anschließend mit 3-OH Benz(a)pyren (1 mM in Methanol) gestartet:	
+ 10 μ l 3-OH Benz(a)pyren	0.05 mM 3-OH BP

Nach 5 minütiger Inkubationszeit stoppte man die Reaktion:

+ 6 ml Methanol/CHCl₃ [1:2 (v/v)], sofort gut mischen.

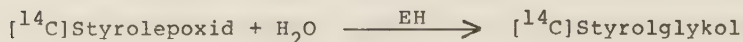
Nachdem sich die Phasen geklärt hatten, wurden aus der oberen, wässrigen Phase 0.9 ml abgenommen und in kleinen Flachbodenreakenzgläser mit 0.1 ml 5 N NaOH gemischt.

Exzitation: 378 nm, Emission 425 nm.

Die Volumenaktivität wurde mit Hilfe einer Eichkurve von Benz(a)pyren-3-glucuronid ermittelt.

3.10.5. Epoxidhydrolase (EH)

Prinzip



Das Epoxid wird durch zweimalige Extraktion mit Hexan aus der Reaktionslösung entfernt, anschließend das gebildete Styrolglykol in Äthylacetat überführt und im Flüssigkeitsszintillationszähler bestimmt.

Durchführung (modifiziert nach Oesch et al., 1971)

Reaktionspuffer: 0.9 M Tris-HCl Puffer, 0.18% Tween-80 (pH 9.0)

[¹⁴C]Styrolepoxidlösung: 48.7 mM [¹⁴C]Styrolepoxid in
Acetonitril (63000 cpm/Testansatz).

Inkubationsansatz (im Reagenzglas, 37°C im Schüttelwasserbad)

Konz. im Test

50,ul Reaktionspuffer	123 mM Tris 0.025% Tween-80
+ 300,ul Zellhomogenat (mind. 300,ug Protein)	
Die Mischung wurde 5 min vorinkubiert und anschließend mit [¹⁴ C]Styrol- epoxid gestartet:	
+ 15,ul [¹⁴ C]Styrolepoxid	2.0 mM Styrolepoxid

Nach 30 minütiger Inkubationszeit stoppte man die Reaktion:

+ 4 ml n-Hexan, sofort gut mischen.

Die organische Phase wurde abgenommen und verworfen. Nach nochmaliger Zugabe von 4 ml Hexan wurde die wässrige Phase selektiv bei -20°C eingefroren; hierdurch wurde die quantitative Entfernung des Hexans möglich. Nach dem Auftauen der wässrigen Phase wurde das gebildete Styrolglykol mit 2 ml Äthylacetat extrahiert. Zur Bestimmung der Radioaktivität wurden 1 ml der Äthylacetatphase in 4 ml Toluolszintillator im LKB-Liquidszintillationszähler 1216 Rackbeta gezählt.

3.11. Bestimmung der Taurocholataufnahme

Prinzip

Inkubationen isolierter Hepatozyten wird [¹⁴C]Taurocholat zugesetzt und die Aufnahme der Gallensäure nach 15, 30 und 45 sec durch Zentrifugation der Zellen durch eine Silikonölschicht in 3 M KOH beendet. Die 'Silikonölfiltration' führt zur

Trennung von Medium und Hepatozyten (Klingenberg & Pfaff, 1967). Das Volumen an mitgerissenem Medium wird in getrennten Inkubationsansätzen durch die Menge an mitgerissenem [Carboxyl- ^{14}C]Dextran, das von den Hepatozyten nicht aufgenommen wird, ermittelt.

Durchführung

Suspensionen ungetrennter, gebundener und ungebundener Hepatozyten in Transportmedium wurden auf gleiche Proteinkonzentrationen eingestellt (1.3-2.0 mg Protein/ml). 0.8 ml Hepatozytensuspension wurden 10 min bei 37°C in kleinen Glasgefäßen präinkubiert, dann wurde die Reaktion durch Zugabe von 8 μl [^{14}C]Taurocholatlösung unterschiedlicher Konzentrationen Taurocholat (0.2, 0.5, 1.0, 5.0 mM) (0.2 $\mu\text{Ci}/\text{Testansatz}$) gestartet. Während der gesamten Inkubationsperiode wurde die Zellsuspension langsam gerührt. Nach 15, 30 und 45 sec stoppte man die Reaktion. Hierzu waren Zentrifugenröhrchen (0.5 ml) vorbereitet worden, die 50 μl KOH-Lösung enthielten, die mit 150 μl Silikonöl (Dichte 1.02 g/ml) überschichtet war. Unmittelbar vor Beendigung der Reaktion wurden 200 μl der Reaktionslösung mit den inkubierten Hepatozyten in die Zentrifugenröhrchen pipettiert. Durch Zentrifugation zu den angegebenen Zeiten in der Beckman 152 Microfuge sedimentierten die Zellen innerhalb von 1-2 sec durch die Silikonölschicht in die KOH-Lösung. Zur Bestimmung des Volumens mitgerissenen Mediums wurde in einem eigenen Inkubationsansatz an Stelle der Taurocholatlösung 8 μl [Carboxyl- ^{14}C]Dextran (0.5 $\mu\text{Ci}/\text{Testansatz}$) zugesetzt. Man ließ die Zentrifugenröhrchen über Nacht stehen, so daß die Zellen von der KOH aufgelöst werden konnten. Am nächsten Tag wurden aus der obersten Phase (enthält die Reaktionslösung) 100 μl entnommen und in ein Szintillationsgefäß pipettiert. Anschließend verschloß man die Zentrifugenröhrchen und schnitt

sie in Höhe der Silikonölschicht durch, übertrug die untere Hälfte in ein Szintillationsgefäß und neutralisierte die KOH mit 50 µl 3 M Trichloressigsäure. Nach Zugabe von 4 ml Szintillationsflüssigkeit (Lumac, Aqua Luma Plus) wurde die Radioaktivität im Szintillationszähler bestimmt. Anschließend erfolgte die Berechnung der Taurocholataufnahme:

1. Korrektur für die mitgerissene Radioaktivität:

$$\text{cpm}_{\text{Sediment korrigiert}} = \text{cpm}_{\text{Sediment}} - \frac{\text{cpm}_{\text{Überstand}} \times \text{cpm}_{\text{Sediment Dextran}}}{\text{cpm}_{\text{Überstand Dextran}}}$$

2. Berechnung des aufgenommenen Taurocholats:

aufgenommenes Taurocholat (nmol/mg Protein) =

$$\frac{\text{cpm}_{\text{Sediment korrigiert}}}{2 \times \text{cpm}_{\text{Überstand}} + \text{cpm}_{\text{Sediment}}} \times \frac{\text{Taurocholat (nmol/ml)}}{\text{Protein (mg/ml)}}$$

Die Taurocholataufnahme wurde in Abhängigkeit der Inkubationszeit aufgetragen und die Aufnahmegeschwindigkeit aus der Steigung der Regressionsgeraden ermittelt. Werte für K_M und V erhielt man aus der Steigung bzw. dem y-Achsenabschnitt der nach Eadie-Hofstee aufgetragenen (V gegen $V/\text{Taurocholatkonz.}$) und durch lineare Regression verbundenen Werte.

3.12. Kultivierung der Leberzellen

Nach ihrer Trennung in y-GT positive und negative Zellen wurden die Hepatozytenfraktionen in Kulturmedium aufgenommen, die Zelldichte in einer Zählkammer ermittelt und in jeder Fraktion eine Zellkonzentration von 3.1×10^6 Hepatozyten/ml eingestellt. Zu den kollagenbeschichteten Petrischalen pipettierte man je 2.1 ml Zellsuspension, so daß eine Zelldichte von 80000 Hepatozyten/cm² auf der Petrischale erreicht wurde. Für die autoradiographischen Studien wurden die Multiwellplatten, die kollagenbeschichtete Kunststoff-Deckplättchen enthielten, verwendet. Hierbei wurde durch Zugabe von 2.3 ml der obigen Zellsuspension pro Loch die gleiche Zelldichte erzielt. Die Kultivierung der Zellen fand im Brutschrank bei 37°C, in wassergesättigter Atmosphäre (5% CO₂/95% Luft) statt. Dem Kulturmedium wurden Hormone in folgenden Konzentrationen zugesetzt: EGF: 10 ng/ml (1.7 nM), Insulin: 2×10^{-2} I.E./ml (160 nM), Glucagon: 350 ng/ml (100 nM) Dexamethason: 100 nM. Nach einer Anheftungsphase von einer Stunde in Gegenwart aller 4 Hormone, wurde das Medium abgesaugt, die Petrischalen mit 2.1 ml PBS (bzw. 2.3 ml bei den Ansätzen für die Autoradiographie), die 10 mM HEPES enthielt, gewaschen. Die Kultivierung der Hepatozyten wurde mit 2.1 ml bzw. 2.3 ml frischem Kulturmedium, das EGF, Insulin, Glucagon und Dexamethason enthielt, fortgesetzt; im Falle der unstimulierten Kontrolle enthielt das Medium nur Dexamethason. Weitere Medienwechsel erfolgten nach 23 und 48 h mit EGF-, Insulin- und Glucagon-haltigem, bzw. hormonfreiem Medium. 4 Stunden vor Beendigung der Kulturen wurden 22 µl (24 µl) [³H]Thymidinlösung [20 µl 0.2 mM Thymidin + 2 µl [³H]Thymidin (1 mCi/ml)] zu jeder Petrischale zugesetzt. Der Versuch wurde durch Absaugen des Mediums und zweimaliges Waschen mit je 2 ml PBS beendet.

Für die Bestimmung des [^3H]Thymidineinbaus in die DNA wurden zu jeder Petrischale 1 ml PBS, die 5 M Harnstoff und 1 mM EDTA enthielt, gegeben, der Zellrasen mit einem Gummischaber abgelöst und in ein Spitzboden-Zentrifugenglas (Schott) überführt. Nach einmaligem Nachspülen der Petrischalen mit 0.5 ml der gleichen Lösung wurde die Suspension bis zur Aufarbeitung bei -80°C eingefroren.

Zur Vorbereitung der Autoradiographie wurden die Zellen auf den Deckplättchen durch dreimalige Behandlung mit je 2 ml Essigsäure/Äthanol 1:3 (jeweils 15 min inkubiert) fixiert, anschließend wurden die Deckplättchen mit einer Pinzette vorsichtig aus den Kulturplatten genommen und nach dem Trocknen mit Entellan auf Objektträger geklebt. Das Entellan ließ man vor der Durchführung der Autoradiographie 2 Tage bei Raumtemperatur aushärten.

3.13 Bestimmung des [^3H]Thymidineinbaus in die DNA

Prinzip

DNA und Proteine werden zunächst durch eine Äthanol-fällung von löslicher Radioaktivität abgetrennt. Anschließend wird die DNA mit Perchlorsäure selektiv hydrolysiert und unlösliche Proteine abzentrifugiert. Ein Teil des Hydrolysats wird zur Radioaktivitätsmessung verwandt, aus dem anderen Teil wird die ursprünglich vorhandene DNA durch Reaktion der freien Desoxyribose mit m-Diaminobezoesäure bestimmt.

Durchführung (modifiziert nach Stout et al., 1980)

Die aufgetauten Proben wurden mit 6 ml kaltem Äthanol (-20°C) versetzt, gemischt und bei -20°C über Nacht stehen gelassen. Nach Zentrifugation [10 min, 5000 Upm in einer Heraeus Christ Zentrifuge (No. 4500)] wurde der Überstand möglichst vollständig abgesaugt und das Sediment in 2 ml 10%iger Trichloressigsäure aufgenommen. Nach Zentrifugation (wie oben) und Absaugen der Trichloressigsäure fügte man 150 μl 7%ige Perchlorsäure (w/v) hinzu und hydrolysierte die DNA bei 60°C 1 h im Schüttelwasserbad. Durch Zugabe von 100 μl 39.5%iger Perchlorsäure (w/v) und 10 minütigem Stehen auf Eis wurden gelöste Proteine wieder ausgefällt und bei 5000 Upm 10 min abzentrifugiert. 200 μl des Überstands wurden abgenommen und mit 600 μl aqua bidest. gemischt (DNA-Hydrolysat). 500 μl des DNA-Hydrolysats wurden mit 50 μl 5 M KOH neutralisiert und die Radioaktivität nach Zugabe von 4 ml Szintillationsflüssigkeit (Lumac, Aqua Luma Plus) gemessen.

Herstellung der Diaminbenzoesäure-Reaktionslösung und Bestimmung der Desoxyribose (nach Thomas & Farquhar, 1978; Vytasek, 1982):

0.2 g Diaminbenzoesäure und 45 mg säuregereinigte Aktivkohle (Norit A) wurden in 1 ml aqua bidest. suspendiert und 20 min bei Raumtemperatur in der Dunkelheit gerührt, anschließend durch einen Millipore Filter (0.45 μm Porengröße) filtriert. 1 Teil der filtrierten Lösung wurde mit 3 Teilen einer 1 N NaOH, die 10 mM Na_2CO_3 enthielt, gemischt und 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln stehen gelassen. Anschließend wurden 200 μl dieser Lösung zu 200 μl DNA-Hydrolysat (im Flachbodenreagenzglas) gegeben und bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Die Reaktion wurde nach 1 h durch Zusatz von 2.5 ml

1 N HCl gestoppt und die Fluoreszenz der Proben bestimmt.
Exzitation: 405 nm, Emission: 503 nm.

Die Fluoreszenzwerte wurden mit einer DNA-Eichgeraden verglichen. Zur Erstellung der Eichkurve wurde Kalbsthymus-DNA in aqua bidest. gelöst, 100 μ l jeder Verdünnung mit 50 μ l 21%iger (w/v) Perchlorsäure versetzt und die DNA wie für die Proben beschrieben, hydrolysiert.

3.14. Autoradiographie

Die Objektträger mit den aufgeklebten Deckplättchen wurden bei völliger Dunkelheit kurz in Filmemulsion (Kodak NTB 2), die zuvor zur Entfernung von Luftblasen für 1 h auf 40°C im Wasserbad temperiert worden war, getaucht. Anschließend wurden die Objektträger für 15 min getrocknet und 8 Tage über Blaugel in einer lichtundurchlässigen Aluminiumbüchse im Kühlschrank gelagert. 2 Stunden vor dem Entwickeln nahm man die Büchse aus dem Kühlschrank, um das Kondensieren von Wasser auf den Präparaten zu verhindern. Zum Entwickeln (1-5) inkubierte man die Objektträger nacheinander in folgenden, ca. 15°C warmen Lösungen (im Dunkeln):

- | | |
|--|-----------|
| 1. Entwickler (Kodak D 19, 40 g/250 ml aqua dest.) | 4 min |
| 2. aqua dest. | 30 sec |
| 3. Fixierlösung (Kodak Unifix, 49 g/250 ml aqua dest.) | 4 min |
| 4. aqua dest. | 3 x 4 min |
| Anschließend wurde bei Licht weitergearbeitet: | |
| 5. fließend wässern (Leitungswasser) | 10 min |

Nach dem Entwickeln wurden die Kerne mit Hämalaun angefärbt. Dazu behandelte man die Objektträger folgendermaßen:

6. Meyer's Hämalaun (unverdünnt)	30 min
7. fließend wässern	10 min
8. Äthanol/HCl (3 ml HCl konz./500 ml 70%iges Äthanol)	5 sec
9. sofort in aqua dest. überführen	1 min
10. fließend wässern	5 min
11. aqua dest.	30 sec

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines automatischen Zählgeräts (Artek counter, model 880), das die Anzahl der blau gefärbten Zellkerne auf einer vorgegebenen Fläche erfaßte. Geschwärzte S-Phase Zellkerne wurden mit dem Auge ausgezählt. Pro Deckplättchen zählte man 20 verschiedene Ausschnitte, die insgesamt 2000-5000 Zellkerne enthielten.

4. Ergebnisse

4.1. Herstellung von polyklonalen Antikörpern gegen y-Glutamyltranspeptidase

Die Trennung y-GT positiver und negativer Hepatozyten aus Lebern von Ratten, die mit einem Leberkanzerogen vorbehandelt worden waren, wurde mit Hilfe von auf Petrischalen fixierten Anti-y-GT Antikörpern durchgeführt. Die Antikörper erhielt man durch Immunisieren von Kaninchen mit gereinigter y-GT, die aus der Rattenniere, einem Organ mit besonders hoher spezifischer y-GT Aktivität (Meister et al., 1981), isoliert worden war. Die gereinigte y-GT aus der Niere, die mit dem Enzym aus präneoplastischen Hepatozyten immunologisch identisch ist (Tsuchida et al., 1979), sollte frei von anderen Membranproteinen, die zur Antikörperbildung führen, sein. Falls diese verunreinigenden Membranproteine auch Bestandteil y-GT negativer Hepatozyten wären, würde es sonst zur Beeinträchtigung der Trennung der Hepatozyten kommen.

Das Membranprotein y-GT wird zunächst durch Extraktion mit Detergentien herausgelöst. Die partielle Proteolyse mit Bromelain, bei der die lipophile Domäne der größeren der zwei Untereinheiten abgespalten wird (Hughey & Curthoys, 1976), überführt das Enzym ohne Aktivitätsverlust in eine wasserlösliche Form, die anschließend säulenchromatographisch gereinigt wird.

4.1.1. Isolierung der γ -Glutamyltranspeptidase

Die γ -GT konnte nach der Methode von Tsuchida et al. (1979) ausgehend von der spezifischen Aktivität 2.0 U/mg Protein im Nierenhomogenat auf 1360 U/mg Protein bei einer Ausbeute von 14% angereichert werden (Tabelle 1). Beim letzten Reinigungsschritt, der G-150 Sephadex Gelchromatographie, erscheint der Aktivitätspeak gleichzeitig mit einem Maximum der Extinktion bei 280 nm (Abb. 1). Tsuchida et al. (1979) und Tate & Meister (1975) erzielten mit 1030 bzw. 1370 U/mg Protein spezifischer Aktivität ähnliche Resultate. Die SDS-Gelelektrophorese der γ -GT zeigte neben den beiden Banden für die Untereinheiten der γ -GT keine Verunreinigungen an.

4.1.2. Charakterisierung des Anti- γ -GT Antiserums

Die Qualität der Anti- γ -GT Antiseren, die durch Immunisierung von Kaninchen mit gereinigter γ -GT erhalten worden waren, wurde durch passive Hämagglutination, Ausfällung des Antigens und Ouchterlony-Doppeldiffusion überprüft.

Bei der Antititerbestimmung durch passive Hämagglutination ergab sich, daß eine Verdünnung des Antiserums von 1:520000 die antigenbeladenen Erythrozyten gerade noch agglutinieren konnte, während vor der Immunisierung Serum desselben Tiers schon bei 8 facher Verdünnung eine negative Reaktion zeigte. Alle verwendeten Antiseren hatten einen Titer (reziproker Wert der höchsten Verdünnung) zwischen 260000 und 520000.

Vorteil des Hämagglutinationstests ist seine hohe Empfindlichkeit, nachteilig ist jedoch, daß das Antigen durch Kopplung mit Glutaraldehyd an die Erythrozyten chemisch verändert wird, so daß die antigenen Determinanten und in der Folge die Antigen-Antikörperwechselwirkungen beeinflusst werden können. Daher ermittelte man zusätzlich die höchste Verdünnung des Antise-

Tabelle 1 Isolierung der γ -Glutamyltranspeptidase aus 130 g Rattennieren

	Volumen		Protein		Aktivität		Ausbeute
	[ml]	Konz.	gesamt	Volumen	gesamt	spezifisch	
	[ml]	[mg/ml]	[mg]	[U/ml]	[U]	[U/mg Prot.]	[%]
1. Homogenat	610	29.5	18000	60	36600	2.0	[100]
2. Tritonextraktion	530	11.5	6100	66	35000	5.7	96
3. Desoxycholatrextraktion	230	2.2	506	102	23500	46	64
4. 50%ige Ammoniumsulfat-fällung (nach Dialyse)	105	2.7	284	120	12600	44	34
5. 70%ige Ammoniumsulfat-fällung (nach Dialyse)	130	0.093	12.1	64	8320	690	23
6. DE-52 Chromatographie	145	0.058	8.4	42	6090	720	17
7. G-150 Sephadex Chromat.	52	0.073	3.8	99	5150	1360	14

Der Proteingehalt wurde nach Peterson (1977), die γ -GT Aktivität nach Szasz (1970) ermittelt, siehe 'Methoden'. Die Isolierung erfolgte wie unter 3.3. beschrieben.

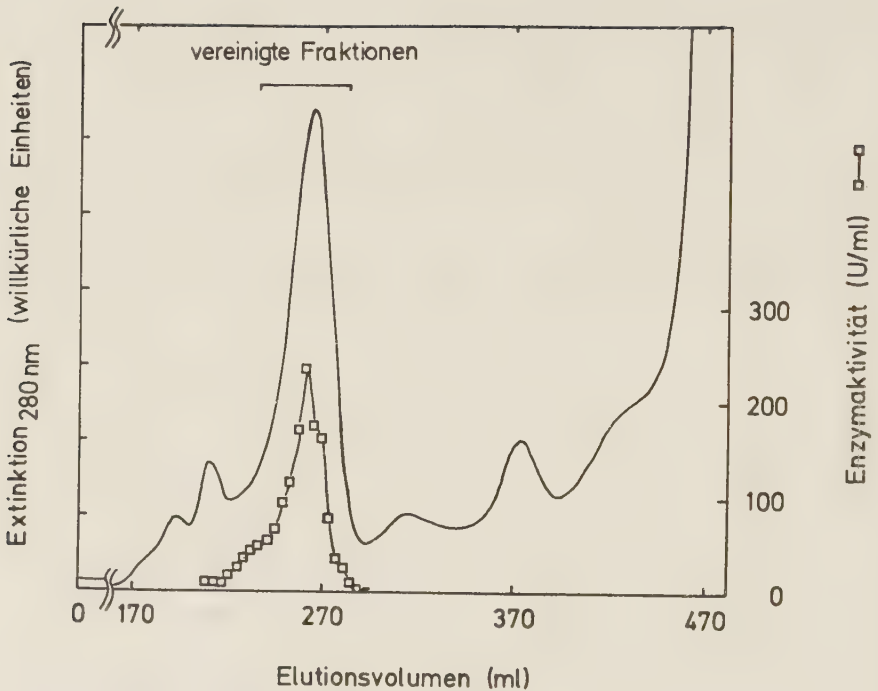


Abb. 1 G-150 Sephadex Gelchromatographie der γ -GT

8.4 mg Protein in 6 ml aqua bidest. wurden an einer Sephadex G-150 superfine Säule (2.6 x 90 cm) chromatographiert. Die Flußgeschwindigkeit betrug 8 ml/h, das Eluat wurde in 4 ml Fraktionen aufgefangen. Die γ -GT Aktivität wurde nach Szasz (1970), wie in Methoden beschrieben, ermittelt.

rums, bei der eine vorgegebene Menge γ -GT annähernd quantitativ gefällt wurde. Es ergab sich, daß ca. 1.6 μ l Antiserum 0.3 U γ -GT aus einem Volumen von 200 μ l fällten (Abb. 2).

Im Ouchterlony-Doppeldiffusionstest zeigte sich nur eine Präzipitationslinie, wenn man die γ -GT gegen das Antiserum diffundieren ließ. Dieser Befund bestätigte, daß es nicht zu nennenswerter Antikörperbildung gegen mögliche, geringfügige Verunreinigungen der γ -GT gekommen war.

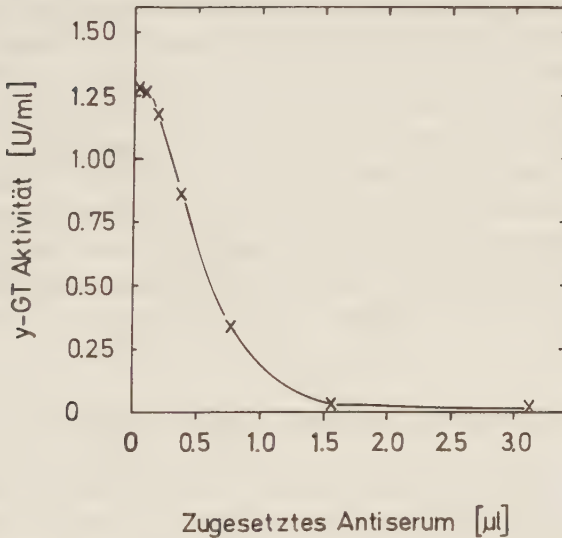


Abb. 2 Fällung der γ -GT mit Antiserum

0.3 U γ -GT in 100 μ l PBS wurden mit 100 μ l 0.9%iger NaCl-Lösung, die unterschiedliche Mengen Antiserum enthielten, versetzt. Nach der Entfernung der gebildeten Antigen-Antikörperkomplexe durch Zentrifugation wurde die im Überstand verbliebene Aktivität der γ -GT wie in 'Methoden' beschrieben, ermittelt.

4.2. Bestimmung des Anteils γ -GT positiver Zellen einer Hepatozytensuspension

Die γ -GT setzt aus dem Substrat N-(γ -L-glutamyl)-1-naphthylamid 1-Naphthylamin frei, das mit Hilfe von Fast Garnet GBC einen Azofarbstoff bildet, der die Zellen rotbraun färbt (Albert et al., 1961). Bei Zellausstrichen auf Objektträgern lösten sich während der Färbung jedoch die meisten Zellen wieder ab. Um dies zu verhindern, wurden die Zellausstriche vor der Färbung durch kurzes Eintauchen in eine 1%ige Celloidinlösung mit einem dünnen Film überschichtet. Celloidin ist Kollodiumwolle, die im wesentlichen aus Dinitrozellulose besteht (Romeis, 1948). Da sich die Celloidinfilme oft während der Färbeprozedur ablösten, untersuchte man die Haftung der Celloidinschicht auf Objektträgern verschiedener Hersteller, sowie auf Kunststoff- und Glasdeckplättchen. Am besten hafteten die Celloidinfilme auf Glasdeckplättchen (Menzel-Gläser 24 x 50 mm), bei deren Verwendung keine Ablösung beobachtet wurde. Zur einfacheren Handhabung wurden die Deckgläser vor dem Ausstreichen der Zellsuspension auf Objektträger aufgeklebt.

4.3. Trennung γ -GT positiver und negativer Hepatozyten

Die präneoplastischen Veränderungen in der Leber wurden durch Behandlung der Ratten mit 2-Acetylaminofluoren (2-AAF) erzeugt. Das Alter der Ratten betrug zu Beginn der Behandlung 6 Wochen; nach 9 wöchiger Gabe eines 0.02% 2-AAF-haltigen Futters erhielten die Tiere noch für 2-9 Wochen das Standardfutter. Die Isolierung der Hepatozyten aus dem Gewebeverband erfolgte durch Perfusion der Leber mit Kollagenase (Berry & Friend, 1969; Schwarz et al., 1980). In den Leberzellsuspensionen waren 7-24% der Zellen γ -GT positiv, der Mittelwert ($\pm$ S.D.) betrug $13.0 \pm 3.9\%$.

Zur Trennung y-GT positiver und negativer Hepatozyten wurde die Panning-Technik (Wysocki & Sato, 1978; Hanigan & Pitot, 1982) angewandt, bei der die Hepatozytensuspensionen auf Anti-y-GT Antikörper-beschichteten Petrischalen inkubiert werden. Die präneoplastischen, y-GT positiven Hepatozyten können über den Antikörper an die Petrischalen binden, während sich y-GT negative Zellen kaum anheften. Ungebundene Zellen wurden nach der Inkubation entfernt, die Petrischalen 2 Mal mit PBS vorsichtig gewaschen und die gebundenen Zellen von den Petrischalen wieder abgelöst. Anschließend charakterisierte man alle drei Zellfraktionen, die ungetrennte Ausgangszellsuspension, die ungebundenen und die gebundenen Hepatozyten.

4.3.1. Beschichtung von Petrischalen mit Antikörpern

Eine Beschichtung von Petrischalen wird durch die Eigenschaft von Polystyrol, Proteine zu adsorbieren, ermöglicht. Bei den Beschichtungsversuchen ergab sich, daß nur Petrischalen für bakterielle Zwecke verwendet werden können, da hydrophile Petrischalen zur Gewebekultur keine meßbaren Antikörpermengen adsorbierten.

Da die meisten Serumproteine mit ähnlicher Affinität binden (Morrissey, 1977), wurde die y-Globulinfraction durch 40%ige Ammoniumsulfatfällung von den übrigen Proteinen grob abgetrennt, um den Anteil der gebundenen Anti-y-GT Antikörper auf den Petrischalen zu erhöhen (Parsons, 1981). Die Menge der adsorbierbaren Antikörper wurde durch Inkubation einer y-GT Lösung in den beschichteten Petrischalen und anschließender Messung der gebundenen y-GT Aktivität bestimmt. Dieser Nachweis ist möglich, da die Bindung von Antikörpern an die y-GT nur zu einem geringfügigen Aktivitätsverlust von ca. 15% (Hanigan & Pitot, 1982) führt.

Die antikörpervermittelte Bindung der γ -GT an die Petrischalen wurde in Abhängigkeit der Proteinkonzentration der zur Beschichtung verwendeten Antikörperlösung untersucht (Abb. 3). Bei Beschichtung mit der höchsten Konzentration ($100 \mu\text{g}$ Protein/ml), die in diesem Experiment eingesetzt wurde, konnten 76 mU γ -GT/Petrischale gebunden werden. Die Verwendung von Be-

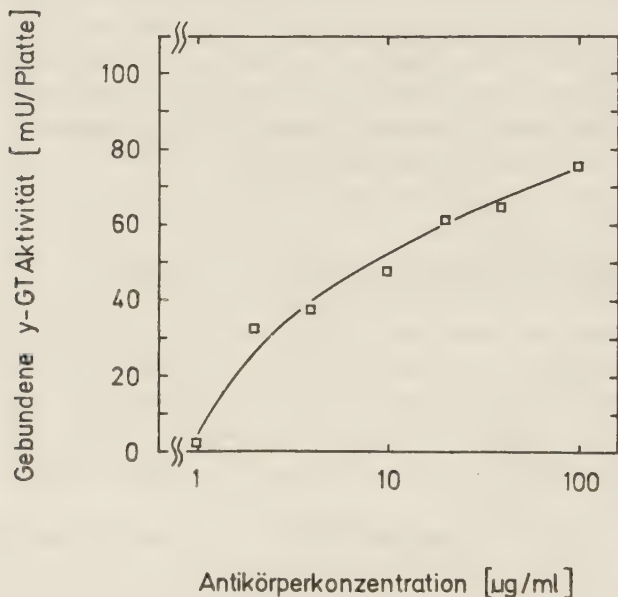


Abb. 3 Gebundene Aktivität der γ -GT pro Petrischale

Bakterielle Petrischalen (Nunc, Durchmesser 5 cm) wurden mit 5 ml Antikörperlösung verschiedener Konzentrationen über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Dekantieren der Antikörperlösung wurden die Petrischalen 3 Mal mit je 5 ml $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freier PBS gewaschen, anschließend mit 5 ml γ -GT Lösung (3 U/ml) für 90 min bei 25°C unter Schütteln inkubiert. Nach Entfernung der γ -GT-Lösung und viermaligem Waschen der Platten mit PBS bestimmte man die Aktivität der gebundenen γ -GT wie in 'Methoden' beschrieben.

schichtungslösungen mit mehr als 100 µg Protein/ml führte zu keiner weiteren Erhöhung der gebundenen γ -GT Aktivität. Hanigan & Pitot (1982), die mit affinitätschromatographisch gereinigten Anti- γ -GT Antikörpern beschichteten, erreichten eine maximale Bindung von 0.8 U/Platte. Berücksichtigt man, daß Hanigan & Pitot größere Petrischalen (10 cm Durchmesser) verwendeten, so erreichten sie die 2.6 fache γ -GT Bindung/Flächeneinheit.

Im Anschluß an die Beschichtung mit Antikörpern wurden weitere hydrophobe Bindungsstellen abgesättigt, indem man PBS, die 5% BSA enthielt, für eine Stunde bei Raumtemperatur in den Petrischalen inkubierte (Parsons, 1981). Dies führte zur Verminderung der unspezifischen Haftung von γ -GT negativen Hepatozyten auf den Petrischalen. Die Bindung der γ -GT an adsorbierte Antikörper wurde durch die Behandlung mit Rinderserumalbumin nicht beeinflusst. Nach der Behandlung mit BSA spülte man die Petrischalen noch dreimal mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freier PBS, saugte die Flüssigkeit ab und lagerte die Petrischalen bis zur Verwendung bei -20°C . Wichtig ist, daß die Spüllösung weder Ca^{2+} noch Mg^{2+} enthält. Bei den ersten Versuchen zur Zelltrennung, bei denen noch mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -haltiger PBS gespült worden war, kam es an Stellen auf der Petrischale, an denen Flüssigkeitsrückstände der Spüllösung eingetrocknet waren, zur unspezifischen Haftung von Hepatozyten. Durch die Eliminierung von Ca^{2+} und Mg^{2+} aus der Spüllösung konnten diese Bereiche beseitigt werden.

4.3.2.Optimierung der Zelltrennung

Hanigan & Pitot (1982) trennten γ -GT positive und negative Hepatozyten durch 15 minütige Inkubation der Zellen auf Anti- γ -GT Antikörper-beschichteten Petrischalen. Inkubationsmedium war Leibovitz L-15 Medium, das zusätzlich 0.2% Rinderserumalbumin

und 18 mM HEPES enthielt, die Inkubationstemperatur betrug 25°C. Sie berichteten von einer Anreicherung y-GT positiver Hepatozyten auf 40-98%, ausgehend von 1-44% y-GT positiven Zellen vor der Trennung. Die Zellausbeute betrug bei Hanigan & Pitot 90000 gebundene Hepatozyten pro Petrischale (Durchmesser 10 cm) bei 12% y-GT positiven Hepatozyten der Ausgangszellsuspension. Die Ablösung der Zellen erfolgte durch festes Anklopfen der Petrischalen, gelang jedoch nicht quantitativ.

Bei den hier beschriebenen Experimenten konnten die gebundenen Zellen durch Ausdrücken von 2.5-5 ml PBS aus einer 2-5 ml Finnpiquette zu ca. 90% abgelöst werden. Der Anteil der Trypanblau-färbbaren Hepatozyten war in der Fraktion der gebundenen Zellen stets geringer als bei den ungebundenen Hepatozyten. Dies zeigt, daß die Zellen bei dieser Ablösungsmethode nicht geschädigt werden. Bei allen folgenden Experimenten wurde die Zahl der 'gebundenen Zellen' erst nach dem Ablösen der Hepatozyten von den Petrischalen ermittelt. Die tatsächliche Anzahl der gebundenen Zellen lag daher etwas höher als angegeben.

Die Durchführung der Zelltrennung unter den Bedingungen von Hanigan & Pitot führte in den eigenen Experimenten zu keiner Anreicherung y-GT positiver Hepatozyten. Da die Zahl der gebundenen Zellen nach einer 15 minütigen Inkubation sehr gering war, erhöhte man die Inkubationszeit auf 60 min. Um die ständige Begasung mit CO₂/Luft (5%/95%), die aufgrund der verlängerten Inkubationszeit zur Stabilisierung des pH-Wertes des Mediums nötig geworden war, zu vermeiden, wurde ein Carbonat-freies Medium verwendet (Abschnitt 2.3. 'Trennmedium').

Unter diesen veränderten Bedingungen ergab sich eine Anreicherung von 10% y-GT positiven Hepatozyten der Ausgangszellsuspension auf ca. 30% in der Fraktion der gebundenen Zellen, bei einer Ausbeute von ca. 50000 gebundenen Hepatozyten pro Petrischale. Bei diesem Experiment wurden 2×10^6 Hepatozyten pro Petrischale inkubiert. Da die Zelltrennung sowohl hinsichtlich

der Ausbeute als auch der Anreicherung γ -GT positiver Hepatozyten unbefriedigend war, wurde versucht, durch Zusätze zum Inkubationsmedium eine geringere unspezifische Haftung γ -GT negativer Hepatozyten und ein schnelleres Anheften γ -GT positiver Zellen zu erreichen.

Ein häufig auftretendes Problem beim Arbeiten mit Zellsuspensionen ist die Verklumpung der Zellen. Zusätze zum Medium, die das Haften der Zellen aneinander verhindern, könnten auch zu einer verminderten unspezifischen Bindung an Petrischalen führen. Eine Ursache für die Aggregation von Zellen kann DNA sein, die aus geschädigten Zellen austritt. Daher führt der Zusatz von DNase zum Medium zur Reduzierung der Verklumpung (Steinberg, 1963). Ein weiteres Agens, das die Zellverklumpung verhindern soll, ist Polyvinylpyrrolidon (Inoue et al., 1965; Bowman & McLaren, 1970a,b).

Der Zusatz von DNase zum Medium bewirkte die erhoffte Verminderung der unspezifischen Haftung. Der Anteil γ -GT positiver Hepatozyten in der Fraktion der gebundenen Zellen konnte von ca. 30 auf ca. 70% gesteigert werden (Abb. 4). Überraschende Resultate ergaben sich beim Zusatz von Polyvinylpyrrolidon: bei PVP-Konzentrationen über 1% nahm die Zahl der gebundenen Hepatozyten pro Petrischale stark zu, während der Anteil der γ -GT positiven Hepatozyten erst bei PVP-Konzentrationen über 5% deutlich sank (Abb. 5). Optimal erschien eine PVP-Konzentration von 5%, bei der mit 1.1×10^5 abgelösten Hepatozyten über 6 Mal so viele Zellen pro Petrischale erhalten wurden wie ohne PVP.

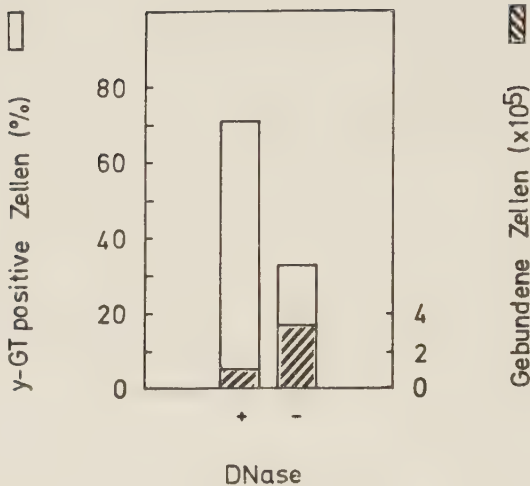


Abb. 4 Einfluß von DNase auf die Anzahl der pro Petrischale gebundenen Hepatozyten und den Anteil γ -GT positiver Zellen in dieser Fraktion

2×10^6 Hepatozyten wurden pro Antikörper-beschichteter Petrischale bei 25°C für 60 min in 5 ml Trennmedium, das 5% PVP enthielt, in An- (+) und Abwesenheit (-) von DNase (100/ $\mu\text{g}/\text{ml}$) inkubiert. Das Ablösen der gebundenen Hepatozyten erfolgte wie beschrieben, der Anteil γ -GT positiver Zellen wurde wie in 'Methoden' angegeben, ermittelt. Die Ausgangszellsuspension enthielt 10% γ -GT positive Hepatozyten. Jede Säule zeigt den Mittelwert aus zwei Inkubationsansätzen.

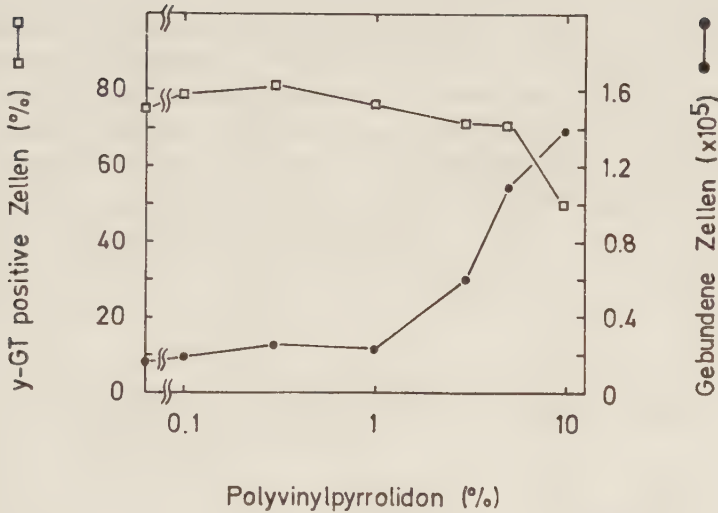


Abb. 5 Einfluß der PVP-Konzentration auf die Anzahl der pro Petrischale gebundenen Hepatozyten und den Anteil y-GT positiver Zellen in dieser Fraktion

Die Trennung der Hepatozyten erfolgte wie in Abb. 4, in Anwesenheit von DNase (100 µg/ml) und unterschiedlichen PVP-Konzentrationen. Die Ausgangszellsuspension enthielt 10% y-GT positive Zellen. Jeder Punkt zeigt den Mittelwert aus zwei Inkubationsansätzen.

4.3.2.1. Temperaturabhängigkeit der Anheftung

Die Trennung von Lymphozytensubpopulationen mit der Panning-technik wird normalerweise bei 4°C durchgeführt (Wysocki & Sato, 1978; Wulff et al., 1982). Bei dieser Temperatur binden Hepatozyten jedoch nicht an Antikörper-beschichtete Petrischalen (Hanigan & Pitot, 1982). Dies weist, zusammen mit dem Be-

fund, daß auch Natriumazid die Bindung inhibiert (Hanigan & Pitot, 1982), darauf hin, daß das Anheften der Hepatozyten ein energieabhängiger Prozeß ist. Die bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführte Zelltrennung zeigte, daß mit steigender Temperatur die Zahl der gebundenen Hepatozyten zunimmt. Die Anreicherung γ -GT positiver Zellen war bei 15°C und 25°C etwa gleich gut, wurde bei Erhöhung der Temperatur auf 37°C jedoch erheblich schlechter (Abb. 6).

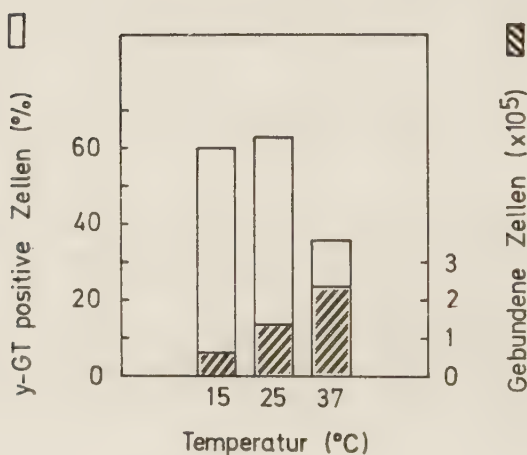


Abb. 6 Einfluß der Temperatur auf die Anzahl der pro Petri-schale gebundenen Hepatozyten und den Anteil γ -GT positiver Zellen in dieser Fraktion

Die Trennung der Hepatozyten erfolgte wie in Abb. 4 beschrieben in Gegenwart von DNase und PVP (5%) bei 15, 25 und 37°C. Die Ausgangszellsuspension enthielt 8% γ -GT positive Hepatozyten. Jede Säule zeigt den Mittelwert aus zwei Inkubationsansätzen.

4.3.2.2. Abhängigkeit der Anheftung von der inkubierten Zellzahl

Zur weiteren Optimierung der Zelltrennung wurde die Zahl der gebundenen Hepatozyten in Abhängigkeit der inkubierten Zellzahl untersucht.

Die Zahl der gebundenen Hepatozyten war bei 4×10^6 inkubierten Zellen pro Petrischale am größten, der Anteil der y-GT positiven unter den gebundenen Hepatozyten änderte sich im Bereich zwischen $2-5 \times 10^6$ inkubierten Zellen nicht (Abb. 7). In allen folgenden Experimenten wurden 4×10^6 Hepatozyten pro Petrischale inkubiert.

4.3.2.3. Beeinflussung der Zelltrennung durch verschiedene Kollagenasechargen

In den vorangegangenen Versuchen hatte sich gezeigt, daß für die Isolierung y-GT positiver Hepatozyten eine 60 minütige Inkubation von 4×10^6 Zellen bei 25°C in Gegenwart von DNase ($100 \mu\text{g/ml}$) und PVP (5%) die besten Resultate ergab. Die Aktivität Fremdstoff-metabolisierender Enzyme (Abschnitt 4.4) wurde an y-GT positiven und negativen Hepatozyten, die unter diesen Bedingungen getrennt worden waren, bestimmt.

Für die Taurocholataufnahme (Abschnitt 4.5) und die Stimulierbarkeit der DNA-Synthese (Abschnitt 4.6.) wurde eine neue Kollagenasecharge verwendet. Die Folge war, daß sich y-GT positive und negative Hepatozyten unter den genannten Bedingungen nicht mehr trennen ließen. Innerhalb von 60 min banden ca. 1×10^6 Hepatozyten pro Petrischale, die einen Anteil von weniger als 20% y-GT positiven Zellen aufwiesen.

Die Zahl der gebundenen Zellen konnte durch Verkürzung der Inkubationszeit, Verringerung der Inkubationstemperatur oder der PVP-Konzentration reduziert werden (Abb. 8). Bei 25°C in

Gegenwart von 5% PVP nahm die Zahl der gebundenen Zellen zwischen der 15. und 25. Minute von 30000 auf 220000 zu, der Anteil γ -GT positiver Zellen sank von 64 auf 50% ab. Um ca. 15 min parallel zu längeren Zeiten hin verschoben war die Bindung der Zellen bei 20°C. Bei beiden Temperaturen war eine genaue Einhaltung der Inkubationszeit erforderlich, um gute Anreicherungen bei akzeptablen Zellausbeuten zu erreichen.

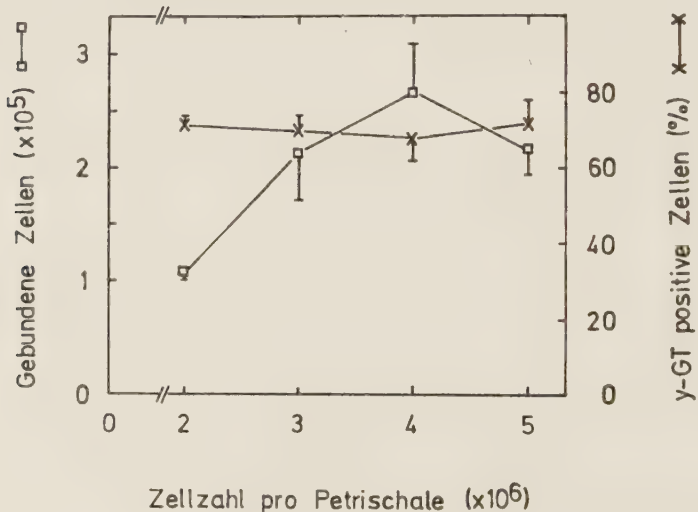


Abb. 7 Einfluß der inkubierten Zellzahl auf die Anzahl der pro Petrischale gebundenen Hepatozyten und den Anteil γ -GT positiver Zellen dieser Fraktion

2, 3, 4 und 5 x 10⁶ Hepatozyten wurden pro Antikörperbeschichteter Petrischale bei 25°C für 60 min in 5 ml Trennmedium, das DNase und PVP (5%) enthielt, inkubiert. Die Ablösung der gebundenen Zellen und die Bestimmung des Anteils γ -GT positiver Hepatozyten erfolgte wie in 'Methoden' angegeben. Die Ausgangszellsuspensionen enthielten 10-14% γ -GT positive Hepatozyten. Jeder Punkt zeigt den Mittelwert ($\pm$ S.D.) aus 3 verschiedenen Experimenten.

Höhere Zellausbeuten ($1.3-1.7 \times 10^5$ gebundene Hepatozyten pro Petrischale), bei einer Anreicherung auf 69 - 65% γ -GT positive Zellen, ergaben sich bei 40-60 minütiger Inkubation in Abwesen-

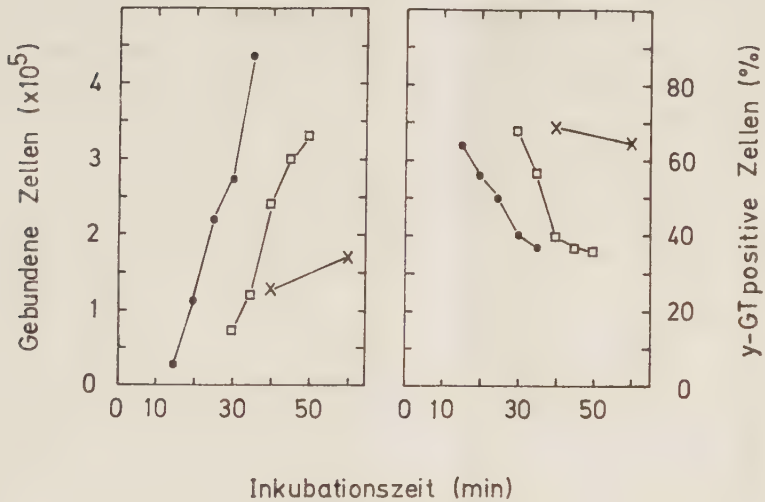


Abb. 8 Temperatur- und Zeitabhängigkeit der Trennung γ -GT positiver und negativer Hepatozyten in An- und Abwesenheit von PVP

4×10^6 Hepatozyten wurden in 5 ml Trennmedium, das DNase (100/ μ g/ml) enthielt auf Antikörper-beschichteten Petrischalen inkubiert.

●—● Inkubation bei 25°C in Gegenwart von PVP (5%)

□—□ Inkubation bei 20°C in Gegenwart von PVP (5%)

x—x Inkubation bei 25°C ohne PVP

Die Ablösung der gebundenen Zellen und die Bestimmung des Anteils der γ -GT positiven Hepatozyten erfolgte wie in 'Methoden' angegeben. Die Ausgangszellsuspension enthielt 20% γ -GT positive Hepatozyten. Jeder Punkt zeigt den Mittelwert aus zwei Inkubationsansätzen.

heit von PVP bei 25°C. Dieses Experiment zeigt, daß es in Gegenwart von PVP zu einer schnelleren Anheftung sowohl γ -GT positiver als auch γ -GT negativer Hepatozyten kommt.

Die Probleme bei der Einstellung geeigneter Trennbedingungen nach Verwendung der neuen Kollagenasecharge zeigte das nächste Experiment (Abb. 9). Obwohl die Hepatozyten ohne PVP inkubiert wurden, kam es zwischen der 20. und 30. Minute der Inkubation zu einem Anstieg der Zahl der gebundenen Zellen von 34000 auf 340000, bei gleichzeitiger Abnahme des Anteils γ -GT positiver

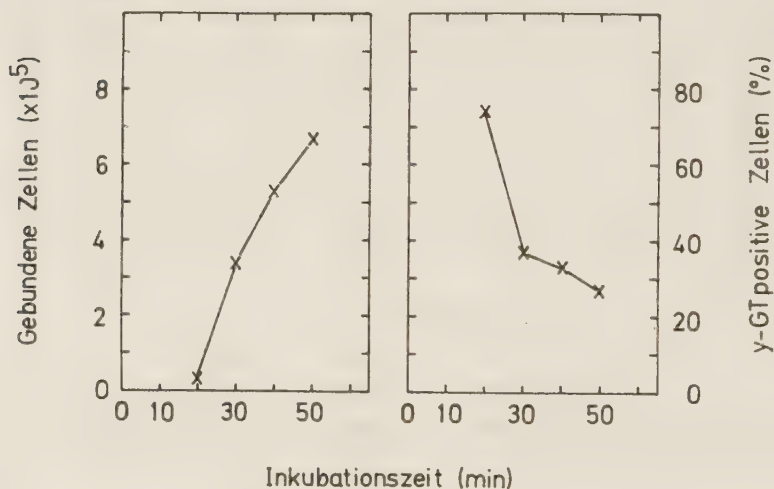


Abb. 9 Zeitabhängigkeit der Trennung γ -GT positiver und negativer Hepatozyten

Die Inkubation erfolgte bei 25°C in Abwesenheit von PVP, sonst wie in Abb. 8. Die Ausgangszellsuspension enthielt 17% γ -GT positive Hepatozyten. Jeder Punkt zeigt den Mittelwert aus zwei Inkubationsansätzen.

Zellen von 74 auf 37%. Diese Variabilität hinsichtlich der Anheftungszeit bei verschiedenen Hepatozytenpräparationen machte eine separate Einstellung der optimalen Inkubationszeit für jeden Versuch erforderlich. Da die Bestimmung des Anteils γ -GT positiver Zellen einen ganzen Tag dauert, die Vitalität der Hepatozyten jedoch bei mehrstündigem Stehen abnimmt, mußte die zur Trennung geeignete Inkubationszeit abgeschätzt werden.

Bei allen Experimenten kam es zu Beginn der Inkubation überwiegend zur Anheftung γ -GT positiver Zellen. Der Anteil der γ -GT positiven Zellen lag bei ca. 10^5 gebundenen Hepatozyten pro Petrischale meist zwischen 60 und 85%. Es genügte daher, die Inkubationszeit zu ermitteln, bei der ca. 10^5 Hepatozyten pro Petrischale gebunden hatten. Mit einiger Erfahrung gelingt die Abschätzung der Zahl der gebundenen Zellen mit dem bloßen Auge. Zur Zelltrennung wurde alle 1.5 min mit der Inkubation von 4×10^6 Hepatozyten in einer beschichteten Petrischale begonnen. Nach 20 min dekantierte man die ungebundenen Zellen der ersten Petrischale, spülte zweimal mit PBS nach und beurteilte die Zahl der gebundenen Zellen anhand der Trübung der Petrischale. Waren zu wenig Zellen gebunden, so beendete man die Inkubation der Hepatozyten auf der nächsten Petrischale erst nach 25 min. Auf diese Weise tastete man sich an die geeignete Inkubationszeit heran und beendete die Inkubation der Hepatozyten in allen übrigen Petrischalen nach dieser Zeit.

4.3.3. Abhängigkeit der Anheftungszeit der Hepatozyten von der Perfusionszeit der Leber mit Kollagenase

Ein Problem bei der Isolierung der Hepatozyten war, daß die Perfusion der Leber mit Kollagenase häufig vorzeitig abgebrochen werden mußte, weil die Pfortader brüchig geworden war. Die Folge war eine unvollständige Dissoziation der Hepatozyten, wodurch sowohl die Ausbeute, als auch die Qualität der Hepatozyten reduziert war. Diese Schwierigkeit trat vorwiegend bei

der Perfusion der Lebern behandelter Ratten auf, da hierbei längere Einwirkungszeiten der Kollagenase als bei Lebern unbehandelter Tiere nötig sind. Eine der Ursachen für die Unterschiede der Anheftungsgeschwindigkeit der Hepatozyten an die Antikörper-beschichteten Petrischalen könnten die unterschiedlichen Perfusionszeiten mit Kollagenase sein.

Die Auftragung der zur Zelltrennung verwendeten Inkubationszeit gegen die Perfusionszeit zeigte, daß eine kürzere Perfusionszeit in der Regel eine Verlängerung der Anheftungszeit der Hepatozyten zur Folge hatte (Abb. 10).

Die Unterschiede in den Anheftungszeiten der Hepatozyten wurden erst seit Verwendung der neuen Kollagenasecharge beobachtet. Ein Grund hierfür ist, daß die Pfortader während der Perfusion der Leber mit der früheren Kollagenase weniger angegriffen wurde, wodurch die Perfusionszeit konstanter (25-33 min) gehalten werden konnte. Wesentlich 'weichere' Lebern, bei denen die Hepatozyten besser dissoziiert waren, erhielt man jedoch mit der neuen Kollagenase.

4.4. Aktivitäten Fremdstoff-metabolisierender Enzyme

Um zu prüfen, ob die Ursache für den selektiven Wachstumsvorteil präneoplastischer, γ -GT positiver Foci gegenüber dem umliegenden Gewebe unter dem Einfluß von Hepatokanzerogenen einem veränderten Metabolismus dieser Verbindungen in γ -GT positiven Hepatozyten zugeschrieben werden kann, wurden die Aktivitäten von Cytochrom P-450 abhängigen Monooxygenasen, der UDP-Glucuronosyltransferase und der Epoxidhydrolase in getrennten, überwiegend γ -GT positiven und negativen Hepatozyten bestimmt. Zur Induktion präneoplastischer Hepatozyten erhielten männliche Wistarratten (6 Wochen alt) wie in den vorangegangenen Experimenten für 9 Wochen ein Altromin-Standardfutter, dem 0.02%

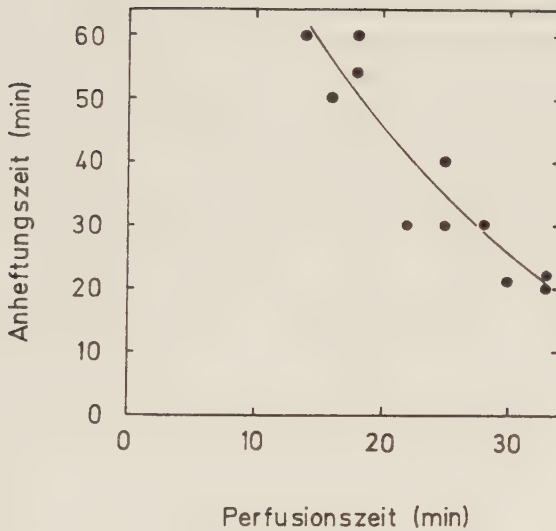


Abb. 10 Abhängigkeit der Anheftungszeit der Hepatozyten von der Perfusionszeit der Leber mit Kollagenase

Für jede Hepatozytensuspension, die durch Perfusion der Leber einer 2-AAF behandelten Ratte erhalten worden war, ermittelte man die optimale Anheftungszeit wie in 'Methoden' beschrieben. Die Inkubation der Hepatozyten auf den Petrischalen erfolgte wie in Abb. 9.

2-AAF zugesetzt worden war. 2-AAF gehört zu den kompletten Kanzerogenen, die sowohl initiierende als auch promovierende Eigenschaften besitzen.

Die Gruppe der Cytochrom P-450 abhängigen Monooxygenasen besteht aus mehreren Enzymen mit unterschiedlicher, teilweise überlappender Substratspezifität (Ryan et al., 1982; Guengerich et al., 1982; Waxman et al., 1985). Bis heute gibt es keine allgemein akzeptierte Nomenklatur zur Bezeichnung der einzelnen Cytochrom P-450 Formen. Traditionell teilt man die Cytochrom P-450 abhängigen Monooxygenasen in Phenobarbital- und Methylcholanthren-induzierbare Formen ein. Daneben lassen sich weitere P-450 Formen nachweisen, die durch keine der genannten Substanzen induziert werden. Diese 'konstitutiven' Enzyme sind teilweise geschlechtsspezifisch (Waxman et al., 1985).

Um einen Überblick über die Enzymaktivitäten der verschiedenen Cytochrom P-450 Formen zu erhalten, wurden die Monooxygenaseaktivitäten mit Hilfe von drei verschiedenen Substraten bestimmt. Während Ethoxyresorufin vorwiegend Substrat einer Monooxygenaseform ist, die durch 3-Methylcholanthren induziert wird (Burke & Mayer, 1974; Guengerich et al., 1982), setzen die durch Phenobarbital induzierbaren Monooxygenasen Aldrin um (Wolff et al., 1979, 1980; Newman & Guzelian, 1983). Neueste Untersuchungen zeigten, daß Aldrin außerdem von allen konstitutiven männlichen Cytochrom P-450 Formen metabolisiert wird (Wolff, persönliche Mitteilung). Benz(a)pyren wird von mehreren Cytochrom P-450 abhängigen Monooxygenasen, einschließlich der bereits genannten Formen metabolisiert (Guengerich et al., 1982).

Die Aktivität der durch polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe induzierbaren UDP-Glucuronosyltransferaseform wurde mit 3-Hydroxybenz(a)pyren als Substrat (Nebert & Gelboin, 1968) bestimmt, die mikrosomale Epoxidhydrolaseform, die durch eine breite Substratspezifität charakterisiert ist (Batt et al., 1984), durch Hydrolyse von Styrolepoxid.

Die Suspensionen isolierter Hepatozyten aus 2-Acetylaminofluoren-behandelten Ratten enthielten 10-24% y-GT positive Zellen. Nach dem Ablösen der Hepatozyten von den Petrischalen betrug der Anteil y-GT positiver Zellen in der Fraktion der gebundenen Hepatozyten 60-87%. Die Hydroxylierung von Benz(a)pyren, die Epoxidierung von Aldrin und die O-Deäthylierung von Ethoxyresorufin waren bei den gebundenen, hauptsächlich y-GT positiven Hepatozyten um 43-54% erniedrigt, im Vergleich zu den Aktivitäten in den ungetrennten Zellen (Abb. 11).

Im Gegensatz hierzu war die Geschwindigkeit der Glucuronidierung von 3-Hydroxybenz(a)pyren und der Hydrolyse von Styrolepoxid in den gebundenen Hepatozyten höher als in ungetrennten und ungebundenen Zellen (Abb. 12). Da die Fraktionen der gebundenen Hepatozyten bzw. der ungetrennten Zellen weder ausschließlich y-GT positive noch y-GT negative Zellen enthielten, extrapolierte man die gemessenen Enzymaktivitäten linear auf 0 bzw. 100% y-GT positive Hepatozyten. Entsprechend dieser Extrapolation waren die Monooxygenaseaktivitäten y-GT positiver Zellen um 70-89% vermindert, während UDP-Glucuronosyltransferase- und Epoxidhydrolase-Aktivitäten etwa doppelt so hoch wie in y-GT negativen Hepatozyten waren (Tabelle 2).

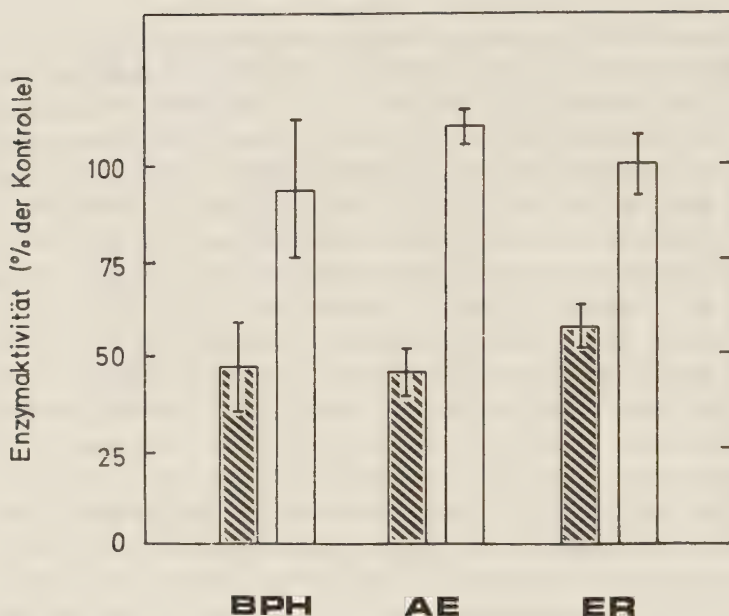


Abb. 11 Aktivitäten Cytochrom P-450 abhängiger Monooxygenasen in gebundenen und ungebundenen Hepatozyten aus 2-AAF behandelten Ratten

Die Hepatozyten wurden durch Inkubation auf Antikörper-beschichteten Petrischalen bei 25°C für 60 min in Gegenwart von 5% PVP getrennt, wie in 'Methoden' beschrieben. Die Aktivitäten in den gebundenen, hauptsächlich γ -GT positiven (schraffierte Säulen) und den ungebundenen (offene Säulen) Hepatozyten wurden auf die Aktivitäten in der Ausgangszellsuspension (Kontrolle = 100%) bezogen. Die Enzymaktivitäten in der Ausgangszellsuspension für die Benz(a)pyrenhydroxylase (BPH), die Aldrinepoxidase (AE) und die Ethoxyresorufindeethylase (ER) betrugen 56 ± 15 , 540 ± 150 und 3.4 ± 0.4 pmol $\times$ (mg Protein $\times$ min) $^{-1}$. Die Ergebnisse sind Mittelwerte ($\pm$ S.D.) aus 5-6 verschiedenen Experimenten. Die Werte für die gebundenen Hepatozyten und die ungetrennten Zellen sind signifikant verschieden ($P < 0.001$, gepaarter t-Test).

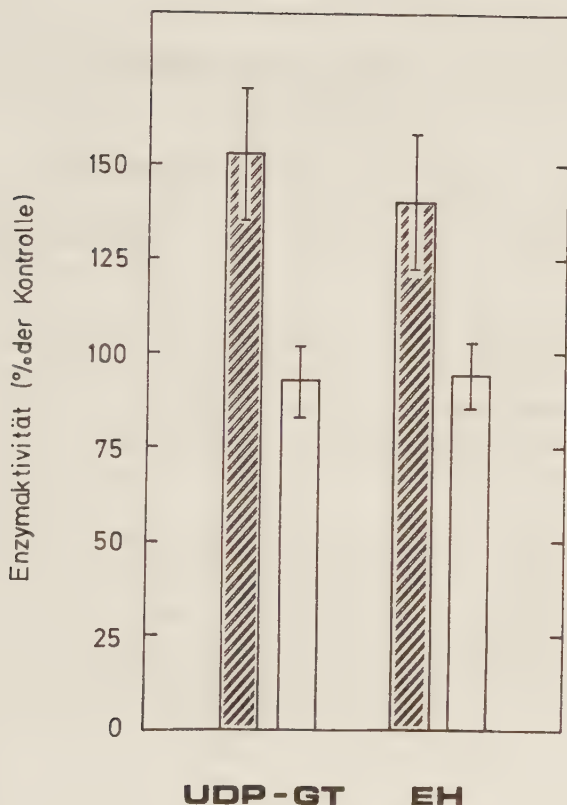


Abb. 12 Aktivitäten der Epoxidhydrolase und der UDP-Glucuronosyltransferase in gebundenen und ungebundenen Hepatozyten aus 2-AAF behandelten Ratten

Die Trennung der Hepatozyten erfolgte wie in Abb. 11. Die Aktivitäten in den gebundenen, hauptsächlich γ -GT positiven (schraffierte Säulen) und den ungebundenen (offene Säulen) Hepatozyten wurden auf die Aktivitäten in der Ausgangszellsuspension (Kontrolle = 100%) bezogen. Die Enzymaktivitäten in der Ausgangszellsuspension für die Epoxidhydrolase (EH) und die UDP-Glucuronosyltransferase (UDP-GT) betrugen 2.7 ± 0.6 und 5.8 ± 0.9 nmol $\times$ (mg Protein $\times$ min) $^{-1}$. Die Ergebnisse sind Mittelwerte ($\pm$ S.D.) aus 6 verschiedenen Experimenten. Die Werte für die gebundenen Hepatozyten und die ungetrennten Zellen sind signifikant verschieden [$P < 0.002$ (EH), $P < 0.001$ (UDP-GT), gepaarter t-Test].

Tabelle 2 Aktivitäten Fremdstoff-metabolisierender Enzyme in
 y-GT positiven Hepatozyten

Enzym	Enzymaktivität
	[% des Wertes in y-GT negat. Zellen]
Benz(a)pyrenhydroxylase	21 $\pm$ 11
Aldrinepoxidase	11 $\pm$ 14
Ethoxyresorufindeethylase	30 $\pm$ 7
UDP-Glucuronosyltransferase	210 $\pm$ 50
Epoxidhydroxylase	190 $\pm$ 50

Die Werte von Abb. 11 und 12 wurden extrapoliert um die Enzymaktivitäten in reinen, y-GT positiven bzw. negativen Hepatozyten abzuschätzen. Hierzu wurden die Enzymaktivitäten in der Fraktion der gebundenen Zellen und der Ausgangszellsuspension für jedes Experiment als Funktion des Anteils y-GT positiver Hepatozyten in den entsprechenden Zellfraktionen aufgetragen und dann linear auf die Aktivitäten bei 0 bzw. 100% y-GT positiven Hepatozyten extrapoliert. Die Werte sind Mittelwerte ($\pm$ S.D.).

4.5. Taurocholataufnahme in γ -GT positive und negative Hepatozyten

Eine mehrwöchige Behandlung von Ratten mit Diäthylnitrosamin führt zur verminderten Fähigkeit der Hepatozyten, das Gallensäureanion Cholat aufzunehmen (Ziegler et al., 1980). Ungeklärt ist, ob darüber hinaus die Aktivität des Gallensäurecarriers in Hepatozyten präneoplastischer Foci verglichen mit Hepatozyten des umliegenden Gewebes reduziert ist. Zunächst überprüfte man, ob eine Behandlung der Ratten mit 2-Acetylaminofluoren ebenso wie die Behandlung der Tiere mit Diäthylnitrosamin die Taurocholataufnahme verringerte. Anschließend wurden Untersuchungen zur Taurocholataufnahme in γ -GT positive und negative Hepatozyten durchgeführt.

Zur Untersuchung dieser Fragestellung inkubierte man die Leberzellen in Transportmedium (Abschnitt 2.3.) und fügte nach 10 min [14 C]Taurocholat hinzu. Nach 15, 30 bzw. 45 sec wurden die Hepatozyten zur Beendigung der Reaktion und Trennung der Zellen vom Medium durch eine Silikonschicht zentrifugiert. Aus der aufgenommenen Radioaktivität läßt sich anschließend die transportierte Taurocholatmenge berechnen.

Nach einer sehr schnellen, konzentrationsabhängigen Adsorption an die Zellmembran war der Taurocholateinstrom während der ersten 45 sec bei den verwendeten Taurocholatkonzentrationen von 2, 5, 10 und 50 μ M linear (Abb. 13). Die Ordinatenabschnitte geben die Menge an adsorbiertem Taurocholat an. Die Auftragung der Werte nach Eadie-Hofstee ergab eine Gerade, aus deren Steigung bzw. Schnittpunkt mit der Ordinate der K_M -Wert bzw V abgelesen werden konnte (Abb. 14).

Die maximale Aufnahmegeschwindigkeit V war bei Hepatozyten, die aus 2-Acetylaminofluoren-behandelten Ratten isoliert worden waren um etwa 50% erniedrigt, verglichen mit Hepatozyten aus unbehandelten, gleichaltrigen Tieren (Abb. 15a). Nicht signifikant verändert waren die K_M -Werte mit $13 \pm 5 \mu$ M bzw. $17 \pm 2 \mu$ M bei Hepatozyten behandelter bzw. unbehandelter Tiere. Nach Be-

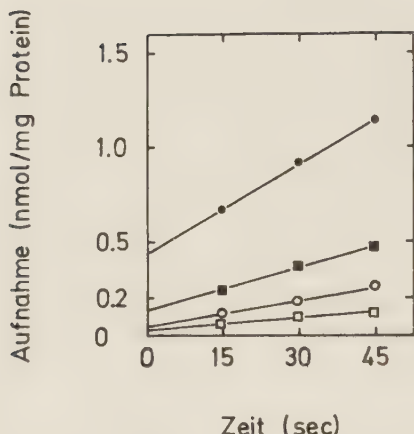


Abb. 13 Anfangsgeschwindigkeit der Taurocholataufnahme in Hepatozyten einer unbehandelten, 19 Wochen alten Ratte

Hepatozyten wurden in Transportmedium, das unterschiedliche Konzentrationen [^{14}C]Taurocholat enthielt, für 15, 30 und 45 sec inkubiert und die Menge aufgenommenes Taurocholat wie in 'Methoden' beschrieben ermittelt. Der y-Achsenabschnitt gibt den Betrag an schnell adsorbiertem Taurocholat an. Die Taurocholatkonzentrationen betragen: 2/ μM (□ — □), 5/ μM (○ — ○), 10/ μM (■ — ■) und 50/ μM (● — ●).

handlung von Ratten mit Diäthylnitrosamin (orale Gabe von 0.5 mg Diäthylnitrosamin pro kg Körpergewicht und Tag für 8 Wochen) wird eine der vorliegenden Arbeit vergleichbare Erniedrigung der Anfangsgeschwindigkeit der Aufnahme von Cholat (1/ μM) auf 35% beschrieben (Ziegler et al., 1980).

Die Aktivität des Gallensäurecarriers war bei Hepatozyten aus der Fraktion der gebundenen, hauptsächlich γ -GT positiven Hepa-

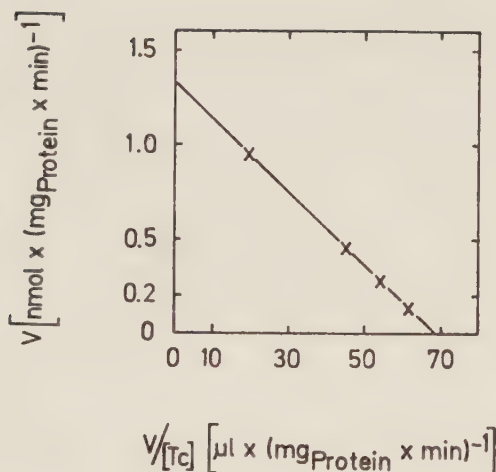


Abb. 14 Aufnahme von Taurocholat in Hepatozyten einer unbehandelten, 19 Wochen alten Ratte. Auftragung nach Eadie-Hofstee.

V (Schnittpunkt mit der Ordinate) und der K_M (negative Steigung der Geraden) wurden durch Auftragung der Werte aus Abb. 13 für die Anfangsgeschwindigkeit der Taurocholataufnahme nach Eadie-Hofstee ermittelt.

tozyten niedriger als bei den ungebundenen Zellen bzw. den ungetrennten Ausgangszellen (Abb. 15b). Die Extrapolation jedes Wertepaares (gebundene bzw. ungetrennte Zellen) einer Zellpräparation zu 100 bzw. 0% γ -GT positiven Hepatozyten ergab, daß die Aktivität des Taurocholatcarriers in γ -GT positiven Hepatozyten um $44 \pm 14\%$ vermindert war, verglichen mit der Aktivität in γ -GT negativen Hepatozyten.

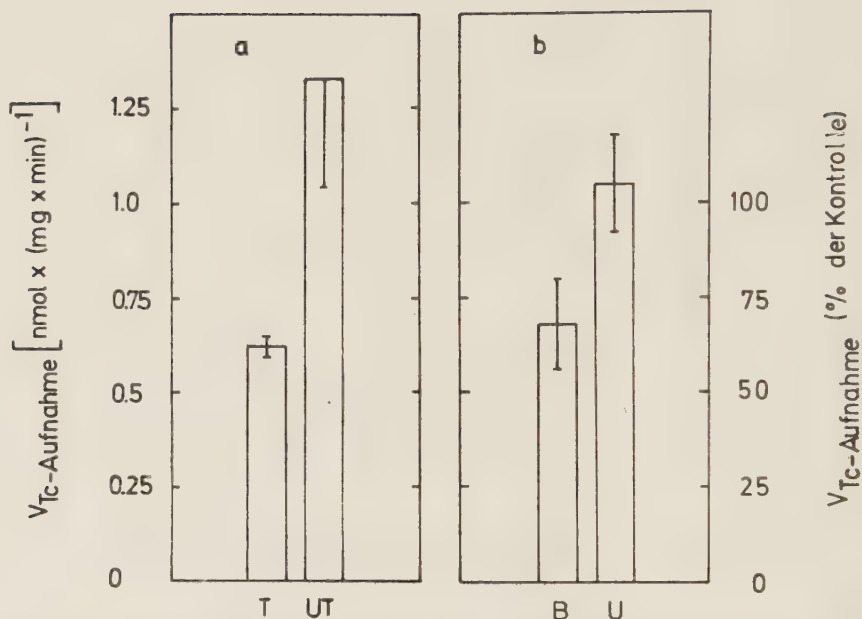


Abb. 15 V der Taurocholataufnahme in (a) Hepatozyten aus unbehandelten und 2-AAF behandelten Ratten und in (b) gebundene und ungebundene Hepatozyten 2-AAF behandelter Ratten

- a) V der Taurocholataufnahme in Hepatozyten von 2-AAF behandelten (T) und unbehandelten (UT) Ratten wurde nach einer Lebenszeit der Ratten von insgesamt 17-20 Wochen ermittelt. Die Werte für die maximale Aufnahmegeschwindigkeit sind Mittelwerte ($\pm$ S.D.) aus 4 verschiedenen Experimenten und für behandelte und unbehandelte Ratten signifikant verschieden ($P < 0.005$, ungepaarter t-Test)
- b) Hepatozyten aus 2-AAF behandelten Ratten (Alter: 17-20 Wochen) wurden durch Inkubation auf Antikörper-beschichteten Petrischalen bei 25°C für 30-60 min in Abwesenheit von PVP wie in 'Methoden' beschrieben getrennt. Die Ausgangszellsuspension enthielt 9-14% γ -GT positive, die Fraktion der gebundenen Hepatozyten 68-82% γ -GT positive Zellen. V des Taurocholats in den gebundenen, hauptsächlich γ -GT positiven (B) und den ungebundenen (U) Hepatozyten wurde auf V in der Ausgangszellsuspension [Kontrolle (100%) = 0.64 ± 0.07 $\text{nmol} \times (\text{mg Protein} \times \text{min})^{-1}$] bezogen. Die Ergebnisse sind Mittelwerte ($\pm$ S.D.) aus 4 verschiedenen Experimenten. Die Werte für die gereinigten, γ -GT positiven Hepatozyten und die ungetrennten Zellen sind signifikant verschieden ($P < 0.02$, gepaarter t-Test).

Der im Rahmen der Meßgenauigkeit unveränderte K_M -Wert bei y-GT positiven Hepatozyten (Tab. 3) legt nahe, daß es sich bei der Reduktion der Taurocholataufnahme eher um eine Verminderung der Zahl der Carriermoleküle in der Zellmembran als um eine Änderung der Affinität des Carriers für Taurocholat handelt.

Die geringere Aufnahme von Taurocholat in y-GT positive Hepatozyten erklärt eine verminderte Sensitivität dieser Zellen gegenüber Phalloidin (Sawada et al., 1982). Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß daneben noch andere Mechanismen, die zur erhöhten Phalloidinresistenz präneoplastischer Hepatozyten beitragen, eine Rolle spielen.

Tabelle 3 K_M -Werte für die Taurocholataufnahme in y-GT positive und negative Hepatozyten

Zellfraktion	K_M -Wert
	[μ M]
gebundene Hepatozyten	12 $\pm$ 8
ungebundene Hepatozyten	15 $\pm$ 8
ungetrennte Ausgangszellen	12 $\pm$ 3

Die Werte sind Mittelwerte ($\pm$ S.D.) aus 4 verschiedenen Experimenten. Einzelheiten siehe Abb. 15b.

4.6. Stimulierbarkeit der DNA-Synthese in getrennt kultivierten, γ -GT positiven und negativen Hepatozyten durch die Hormone EGF, Insulin und Glucagon

Die Untersuchungen zur Stimulierbarkeit der DNA-Synthese an isolierten Hepatozyten erfordern eine Kultivierung der Zellen. Der Grund hierfür ist, daß ein nennenswerter Anstieg der DNA-Synthese in isolierten Hepatozyten aus adulten Ratten frühestens nach 24 stündiger Inkubationszeit mit den stimulatorischen Faktoren stattfindet (Richman et al., 1976; Friedman et al., 1981; McGowan et al., 1981; Tomita et al., 1981; Hayashi & Carr, 1984; Sand et al., 1985). Am geeignetsten erschien eine Kulturdauer von 3 Tagen, da der stimulatorische Effekt der Hormone EGF, Insulin und Glucagon am 3. Tag ausgeprägter als am 2. Tag ist (McGowan et al.; Hayashi & Carr, 1984).

Längere Kulturzeiten sind nachteilig, da die Hepatozyten im Verlauf der Kultivierung dedifferenzieren (Bissel & Guzelian, 1980; Ichihara et al., 1982; Guguen-Guillouzo & Guillouzo, 1983). Außerdem kann die Messung des $[^3\text{H}]$ Thymidineinbaus durch eine mögliche Proliferation anderer Zelltypen, welche die Hepatozytenpräparation geringfügig verunreinigen, verfälscht werden (McGowan et al., 1981). Durch Substitution von Arginin durch Ornithin im Medium ist die DNA-Synthese dieser Zellen in den ersten 3 Kulturtagen unterdrückt (Leffert & Paul, 1972).

Zunächst wurde die Stimulierbarkeit der replikativen DNA-Synthese in ungetrennt kultivierten Hepatozyten aus 2-AAF behandelten Ratten durch die Hormone EGF, Insulin und Glucagon untersucht. In Anwesenheit der Hormone kam es zu einem über 5 fachen Einbau von $[^3\text{H}]$ Thymidin in die DNA verglichen mit der unstimulierten Kontrolle (Abb. 16). Die unter stimulatorischen Bedingungen gemessene Einbaurrate ist hauptsächlich auf replikative DNA-Synthese im Zellkern zurückzuführen, da Hydroxyharnstoff, der selektiv die replikative DNA-Synthese hemmt (Clever, 1969), den $[^3\text{H}]$ Thymidineinbau auf weniger als 20% reduzierte.

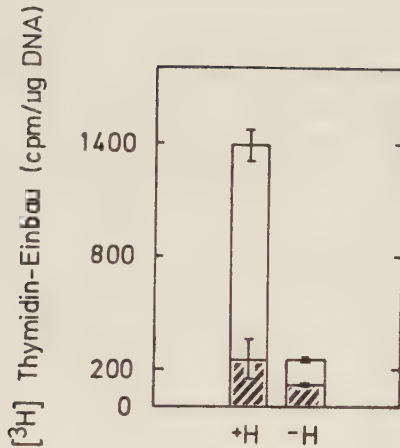


Abb. 16 Stimulierung der DNA-Synthese in Hepatozyten aus 2-AAF behandelten Ratten

Hepatozyten aus 2-AAF behandelten Ratten wurden 3 Tage in An- (+ H) und Abwesenheit (- H) von EGF (1.7 nM), Insulin (160 nM) und Glucagon (100 nM) kultiviert. 4 h vor Beendigung der Kultur wurde [³H]Thymidin (Endkonz. 2 µM) (offene Säulen) zugegeben. Gleichzeitig mit [³H]Thymidin fügte man bei einigen Kulturen Hydroxyharnstoff (Endkonz. 10 mM) (schraffierte Säulen) hinzu. Die DNA wurde isoliert und die spezifische Radioaktivität bestimmt, wie in 'Methoden' angegeben. Die Ergebnisse sind die Mittelwerte ($\pm$ S.D.) aus zwei verschiedenen Experimenten.

In weiteren Experimenten untersuchte man, ob eine erhöhte Stimulierbarkeit der replikativen DNA-Synthese in γ -GT positiven Hepatozyten beobachtet werden kann. Hierzu wurden γ -GT positive und negative Hepatozyten aus 2-AAF behandelten Ratten getrennt und anschließend in An- und Abwesenheit der genannten Hormone kultiviert. Hepatozyten der Fraktion der gebundenen, hauptsächlich γ -GT positiven Zellen zeigten jedoch weder in An- noch in Abwesenheit der Hormone einen höheren [^3H]Thymidineinbau in die DNA verglichen mit ungebundenen und ungetrennten Hepatozyten (Abb. 17a).

Auch der autoradiographisch ermittelte Anteil der S-Phase Kerne nach Kultivierung der Hepatozyten unter den gleichen Bedingungen war bei den γ -GT positiven Zellen nicht erhöht (Abb. 17b).

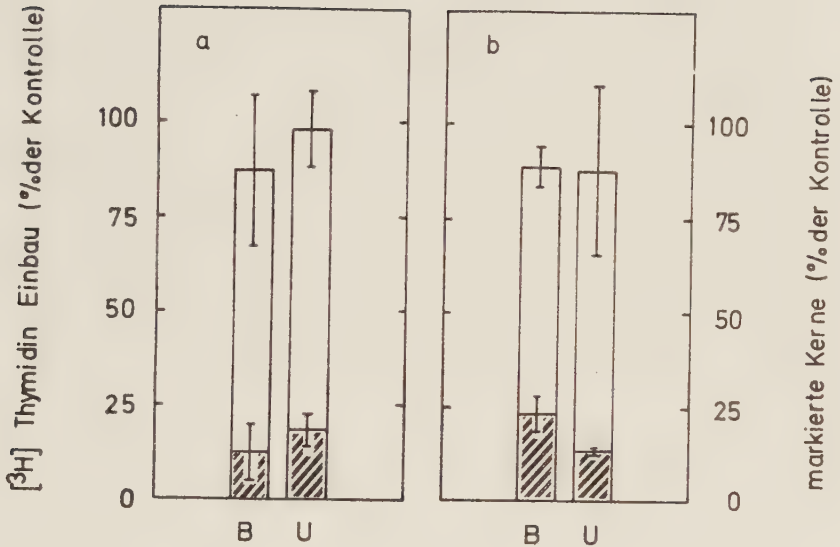


Abb. 17 Stimulierung der DNA-Synthese in kultivierten, hauptsächlich γ -GT positiven bzw. negativen Hepatozyten

Hepatozyten von 17-21 Wochen alten, 2-AAF behandelten Ratten wurden durch Inkubation auf Antikörper-beschichteten Petrischalen bei 25°C für 30-60 min in Abwesenheit von PVP wie in 'Methoden' beschrieben getrennt. Die Ausgangszellsuspension enthielt 7-13%, die Fraktion der gebundenen Hepatozyten 50-70% γ -GT positive Hepatozyten. Gebundene (B), ungebundene (U) und ungetrennte Hepatozyten wurden getrennt kultiviert in An- (offene Säulen) und Abwesenheit (schraffierte Säulen) der Hormone EGF, Insulin und Glucagon, wie in Abb. 16. Die Werte für die gebundenen und ungebundenen Hepatozyten wurden auf die Werte für die ungetrennten Zellen in Anwesenheit der Hormone (Kontrolle = 100%) bezogen.

- Der $[^3\text{H}]$ Thymidineinbau bei der Kontrolle betrug 1740 ± 620 cpm/ μg DNA (Mittelwert $\pm$ S.D. aus 4 verschiedenen Experimenten).
- Der Anteil der geschwärzten (markierten) S-Phase Kerne in der stimulierten Kontrolle betrug $9.3 \pm 2.0\%$ (Mittelwert $\pm$ S.D. aus 2 verschiedenen Experimenten).

5. Diskussion

Isolierung präneoplastischer Hepatozyten

Die Isolierung vitaler, präneoplastischer Zellen ist eine wesentliche Voraussetzung um die biochemisch-zellbiologischen Veränderungen, die mit der Entwicklung zur Tumorzelle verbunden sind, aufzuklären. Die Eigenschaft präneoplastischer Hepatozyten, die y-GT zu exprimieren, ermöglicht die Trennung präneoplastischer von 'normalen' Hepatozyten. Störend auf die Isolierung der Hepatozyten könnte sich jedoch die Anwesenheit nichtpräneoplastischer y-GT positiver Zellen der Leber auswirken. Die y-GT konnte ebenfalls in epithelialen Zellen der Gallengänge und in Ovalzellen nachgewiesen werden (Sirica & Cihla, 1984; Tsao et al., 1984; Yaswen et al., 1984). Die Kontamination der Hepatozytensuspension mit Gallengangs- und Ovalzellen ist jedoch vernachlässigbar, da diese Zellen bei der Perfusion der Leber mit Kollagenase praktisch nicht freigesetzt werden (Yaswen et al., 1984).

Neben diesen nicht-parenchymalen Leberzellen können gelegentlich y-GT positive Hepatozyten in der Nähe der Gallengänge nachgewiesen werden. Sie entstehen ebenfalls in Folge der Behandlung mit Leberkanzerogenen, werden jedoch nicht als präneoplastische Hepatozyten angesehen. Die quantitative Auswertung aller y-GT positiven Areale, die in Leberschnitten nach der Vorbehandlung der Ratten mit 2-AAF nachgewiesen werden konnten, ergab, daß über 90% der y-GT positiven Hepatozyten in präneoplastischen Foci lokalisiert waren (Deml, persönliche Mitteilung). Die isolierten y-GT positiven Zellen sollten daher hauptsächlich präneoplastische Hepatozyten sein.

y-GT positive und negative Hepatozyten wurden mit Hilfe von Petrischalen, die mit Anti-y-GT Antikörper beschichtet worden waren, getrennt. Im Gegensatz zu Hanigan & Pitot (1982) erfolg-

te die Beschichtung nicht mit affinitätschromatographisch gereinigten Antikörpern, sondern mit einer γ -Globulinfraktion, die durch 40%ige Ammoniumsulfatfällung aus dem Antiserum erhalten worden war. Die Antikörperdichte auf den beschichteten Petrischalen war daher etwas geringer (2.6 fach), als bei Hanigan & Pitot.

Eine Erniedrigung der Antikörperdichte muß allerdings nicht die Trennung beeinträchtigen. Wysocki & Sato (1978) konnten selbst bei einer 10-40 fachen Verdünnung der spezifischen Antikörper mit unspezifischen Immunglobulinen B- und T-Lymphozyten trennen. Wurde mit unverdünntem Antikörper beschichtet, so konnten die gebundenen B-Lymphozyten nicht mehr von den Petrischalen abgelöst werden. Während die Ablösung gebundener Zellen in den eigenen Experimenten keine Schwierigkeiten bereitete, berichteten Hanigan & Pitot, daß eine geringfügige Überschreitung der von ihnen gewählten 15 minütigen Inkubationszeit zu einer sehr festen Bindung γ -GT positiver Hepatozyten an die Petrischalen führte, so daß es bei der Ablösung der Zellen zu einem Vitalitätsverlust kam. Es erschien daher nicht erforderlich, die Antikörper affinitätschromatographisch zu reinigen, um eine höhere Antikörperdichte auf den Petrischalen zu erhalten.

Die Bindung von Hepatozyten an Petrischalen, die entweder mit Antikörpern gegen Oberflächenproteine oder mit Substanzen der extrazellulären Matrix wie Kollagen und Fibronectin beschichtet wurden, ist stark temperaturabhängig und erfolgt nur in Anwesenheit bivalenter Kationen wie Ca^{2+} und Mg^{2+} (Seglen & Gjessing, 1978; Gjessing & Seglen, 1980; Hanigan & Pitot, 1982; Johansson & Höök, 1984).

Diese Befunde legen nahe, daß die Anheftung von Hepatozyten keine einfache Wechselwirkung zwischen γ -GT und Anti- γ -GT Antikörpern, ähnlich einer Rezeptor-Ligand Bindung ist, sondern ein komplexer, energieabhängiger Prozess, wie auch die Hemmbarkeit mit Natriumazid (Hanigan & Pitot, 1982) zeigt. Aufgrund der

Größe der Hepatozyten (25 µm Durchmesser), sind wahrscheinlich viele Antigen-Antikörperbindungen zwischen den Zellen und der Petrischale erforderlich, um die Ablösung der Hepatozyten durch Scherkräfte, die während der Waschvorgänge auftreten, zu verhindern. Nach Ausbildung der ersten Bindungen zwischen der y-GT der Zelle und dem gebundenen Antikörper könnte daher das Ansammeln von weiteren, über die Zellmembran verteilten y-GT Molekülen an der Zellunterseite, die mit den Petrischalen in Kontakt steht, nötig sein, um die Bindung zu verstärken. Auch bei der Anheftung von Hepatozyten an Kollagen-beschichtete Petrischalen scheint die Ausbildung von Klustern aus Kollagenrezeptoren erforderlich zu sein (Rubin et al., 1981a).

Eine andere Möglichkeit, die Energie- und Temperaturabhängigkeit der Bindung zu erklären, ist, daß die Leberzelle, nachdem eine erste Fixierung an die Platte über die y-GT stattgefunden hat, Substanzen synthetisiert und sezerniert, die zur Verstärkung der Bindung der Leberzellen an die Petrischalen führen. Das sogenannte 'Zellspreading' tritt während der Kultivierung von Hepatozyten auf und besteht in einem Abflachen und Ausbreiten der Hepatozyten, so daß die Zellen bei genügend hoher Zelldichte einen geschlossenen Zellrasen bilden. Für diesen Prozess ist die Sekretion von Fibronectin durch die Leberzelle erforderlich, sofern die Petrischalen, auf denen die Hepatozyten kultiviert wurden, mit Antikörpern gegen Oberflächenantigene der Leberzelle beschichtet wurden (Rubin et al., 1981b).

Bei der Anheftung der Hepatozyten im Verlauf der Zelltrennung scheint dies jedoch keine Rolle zu spielen, da während der ersten 4 Stunden kein Fibronectin von den Hepatozyten gebildet wird (Voss et al., 1979). Auch für die Bindung von Hepatozyten an Laminin- und Fibronectin-beschichtete Petrischalen scheint eine Neusynthese von Proteinen nicht erforderlich (Seglen & Fossa, 1978; Johansson et al., 1981), da die Anheftung auch in Gegenwart des Proteinbiosynthesehemmers Cycloheximid erfolgt.

Die Ursache für das veränderte Anheftungsverhalten der Hepatozyten bei Verwendung verschiedener Kollagenasechargen ist vermutlich auf die unterschiedliche Enzymzusammensetzung der Kollagenasen zurückzuführen, die zu einer erheblichen Variabilität der Qualität der Hepatozyten führt (Queral et al., 1984; Hefley et al., 1981). Die käuflichen Kollagenasen, die aus dem Kulturfiltrat von *Clostridium histolyticum* stammen, setzen sich aus mehreren proteolytischen und glycosidolytischen Aktivitäten zusammen (Hefley et al., 1981; Hatton et al., 1983). Werden die proteolytischen Enzyme getrennt und die einzelnen Fraktionen hinsichtlich ihrer Fähigkeit, die Hepatozyten aus der Leber freizusetzen, geprüft, so zeigt sich, daß nur bei gleichzeitiger Anwesenheit mehrerer Enzyme ein befriedigendes Ergebnis hinsichtlich der erhaltenen Zellzahl pro Leber, als auch der Zellvitalität erzielt wird (Hatton et al., 1983).

Die Geschwindigkeit mit der die Hepatozyten an Petrischalen binden, variiert von einem Experiment zum nächsten (Gjessing & Seglen, 1980). Bei den eigenen Experimenten zeigte sich, daß die Hepatozyten umso schneller anhefteten, je besser das Lebergewebe durch die Kollagenaseperfusion dissoziiert worden war. Offensichtlich begünstigt eine vollständige Verdauung extrazellulärer Matrixproteine die Anheftung der Hepatozyten, möglicherweise aufgrund einer besseren Zugänglichkeit der membrangebundenen γ -GT für die fixierten Anti- γ -GT Antikörper.

Aktivitäten Fremdstoff-metabolisierender Enzyme

Die Aktivitäten der Fremdstoff-metabolisierenden Enzyme in γ -GT positiven Zellen zeigen ähnliche Veränderungen wie in hyperplastischen Noduli. Im Falle der Cytochrom P-450 abhängigen Hydroxylierungen wurde eine 50-95%ige Abnahme der Aktivität in Noduli gezeigt, während Epoxidhydrolase und UDP-Glucuronosyltransferase die 2.2 bzw. 5 fache Aktivität aufwiesen (Okita et

al., 1976; Bock et al., 1982; Aström et al., 1983; Batt et al., 1984; Farber, 1984b).

Die unterschiedlich starke Zunahme der UDP-Glucuronosyltransferaseaktivität in y-GT positiven Foci und hyperplastischen Noduli (Bock et al., 1982) liegt wahrscheinlich am unterschiedlichen Entwicklungsstadium der präneoplastischen Hepatozyten. Fischer et al. (1983) bestimmten die Aktivität der UDP-Glucuronosyltransferase in mikrodisektierten Foci und fanden eine 2.2 fache Aktivitätszunahme verglichen mit dem umliegenden Gewebe, nachdem die Ratten 147 Tage 2-AAF im Futter erhalten hatten. Hielt man die Tiere anschließend noch weitere 73 Tage auf Normalfutter, so unterschieden sich die Aktivitäten der UDP-Glucuronosyltransferase in präneoplastischen Foci und umliegendem Gewebe um das 5.1 fache.

Die verminderte Metabolisierung von allen drei untersuchten Substraten durch Cytochrom P-450 abhängige Monooxygenasen in y-GT positiven Hepatozyten beweist jedoch nicht, daß der Gehalt sämtlicher Cytochrom P-450 Formen in präneoplastischen Hepatozyten reduziert ist. Schulte-Hermann et al. (1984) zeigten in präneoplastischen Foci eine erhöhte Bindung von Antikörpern, die gegen die Hauptform der Phenobarbital-induzierbaren Monooxygenasen gerichtet waren. Die präneoplastischen Foci waren durch einmalige Gabe von N-Nitrosomorpholin erzeugt worden. Ebenfalls mit immunhistochemischer Methodik bestätigten Buchmann et al. (1985), daß auch bei einer auf 10 Tage begrenzten Gabe von Diäthylnitrosamin die immunhistochemisch nachweisbare Menge dieses Enzyms 9 Wochen nach der Behandlung in präneoplastischen Foci erhöht war. Eine kontinuierliche Behandlung mit Diäthylnitrosamin über mehrere Wochen ergab jedoch einen leicht verminderten Enzymspiegel. Offensichtlich führt eine kurzzeitige Behandlung der Tiere mit einem Leberkanzerogen zu einer vorübergehenden Erhöhung des Gehalts dieser Cytochrom P-450 Form. Die Bedeutung dieses Befundes für die Aktivierung von Hepatokanzerogenen ist wahrscheinlich gering, da von allen Cytochrom

P-450 abhängigen Monooxygenasen der Anteil dieses Enzyms in der Leber der adulten Ratte geringer als 8% ist (Waxman et al., 1985). Der Gehalt aller anderen, von Buchmann et al. (1985) immunhistochemisch nachgewiesenen Cytochrom P-450 Formen war in präneoplastischen Foci erniedrigt.

Eine Konsequenz der veränderten Aktivitäten Fremdstoff-metabolisierender Enzyme ist die verminderte Zytotoxizität von 2-AAF für γ -GT positive Hepatozyten. In Anwesenheit dieses Hepatokanzerogens besitzen präneoplastische Zellen daher einen selektiven Wachstumsvorteil gegenüber 'normalen' Hepatozyten, der zur Vergrößerung der präneoplastischen Foci führen könnte. Der tumorpromovierenden Wirkung von nicht zytotoxischen Verbindungen, wie Phenobarbital (Peraino et al., 1973; Pitot et al., 1978) und Lipidsenkern (Clofibrat, Nafenopin) (Reddy & Rao, 1978; Mochizuki et al., 1982), müssen jedoch andere, bisher ungeklärte Mechanismen zugrunde liegen.

Taurocholattransport

Leberzellen akkumulieren Taurocholat über einen Symport mit Na^+ (Schwarz et al., 1975). Außer der Leber sind auch Ileum und Niere in der Lage, Taurocholat aktiv zu transportieren, jedoch liegen die K_M -Werte für den Taurocholattransport in diesen Organen etwa um eine Zehnerpotenz über dem K_M -Wert in der Leber (Schwenk et al., 1983; Schwenk, 1985). Im Gegensatz zur Leberzelle ist die Darmzelle nicht in der Lage, Phalloidin zu transportieren (Petzinger et al., 1982).

Diese Befunde legen nahe, daß Leber und Ileum bzw. Niere über verschiedene Carriersysteme für Gallensäuren verfügen. Die Aufnahme von Taurocholat über den leberspezifischen Carrier kann daher zur Untersuchung des Differenzierungsgrades der Hepatozyten herangezogen werden.

Der reduzierte Taurocholattransport in γ -GT positive Hepatozyten zeigt, daß die Leistungsfähigkeit präneoplastischer Zellen hinsichtlich dieser organspezifischen Funktion eingeschränkt ist. Den völligen Verlust des Gallensäurecarriers zeigten Kroker et al. (1978) in neoplastischen Zellen aus der Leber am Beispiel der AS-30 D Ascites Hepatoma Zelllinie. Andere Hepatomazelllinien erwiesen sich als Phalloidin-insensitiv (Grundmann et al., 1978), da sie Phalloidin nicht aufnehmen konnten. Dieser Befund läßt ebenfalls auf die Abwesenheit des Gallensäurecarriers schließen. Im Laufe der Tumorentstehung in der Leber scheint es also zur langsamen Dedifferenzierung der Hepatozyten zu kommen. Erste Veränderungen in dieser Richtung lassen sich schon an frühen Tumorstadien erkennen.

Stimulierbarkeit der DNA-Synthese durch EGF, Insulin und Glucagon

Die replikative DNA-Synthese ist in präneoplastischen Foci der Leber erhöht, verglichen mit dem umliegenden Gewebe (Pugh & Goldfarb, 1978; Schulte-Hermann et al., 1981). Unter den Kulturbedingungen der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente, gelang es jedoch nicht, die DNA-Synthese in isolierten γ -GT positiven Hepatozyten stärker als in γ -GT negativen Zellen zu stimulieren.

Welche Hormonfaktoren nach einer partiellen Hepatektomie in vivo das Wachstum des übriggebliebenen Teils der Leber stimulieren, ist umstritten. Die Anwesenheit von Insulin und Glucagon scheint zwar für die Regeneration der Leber notwendig zu sein, beide Hormone kommen jedoch als primäre Initiatoren des Leberwachstums und der damit verbundenen Zellteilung der Hepatozyten nicht in Betracht. Bucher & Swaffield (1975) untersuchten die DNA-Synthese in der Leber von Ratten, denen neben einem Teil der Leber auch Gastrointestinaltrakt, Pankreas und Milz

entfernt worden waren. Die DNA-Synthese in Lebern dieser Ratten war drastisch reduziert, verglichen mit Tieren, denen nur ein Teil der Leber entfernt worden war. Durch Infusion eines Insulin/Glucagon-Gemisches konnte die DNA-Synthese auf die Syntheserate, die in teilhepatektomierten Ratten beobachtet wird, angehoben werden. Keine Stimulierung der DNA-Synthese konnte dagegen bei Infusionen von Glucagon und Insulin in Lebern nicht hepatektomierter Ratten beobachtet werden (Bucher & Swaffield, 1975), beide Hormone können daher nur synergistische Funktion haben.

Auch bei der Inkubation primärer Hepatozytenkulturen mit Insulin oder Glucagon ist die Stimulierung der DNA-Synthese nur gering (McGowan et al., 1981; Richman et al., 1976; Friedman et al., 1981). Beide Hormone haben nur bei gleichzeitiger Anwesenheit von EGF einen ausgeprägten Effekt. Außerdem liegen die stimulatorischen Konzentrationen von Glucagon, meist werden 40-400 nM eingesetzt (McGowan et al., 1981; Hayashi & Carr, 1984), weit über der physiologischen Glucagonkonzentration von 0.04-0.08 nM, gemessen im Portalblut der Ratte (Bucher et al., 1978). Gleiches gilt für die Insulinkonzentrationen, hier werden 10-1300 nM Insulin verwendet (Richman et al., 1976; Tomita et al., 1981; McGowan et al., 1981; Hayashi & Carr, 1984), während bei der Ratte eine Konzentration von 0.5-0.7 nM Insulin im Portalblut vorliegt (Bucher et al., 1978).

Im Gegensatz zu Insulin und Glucagon ist der epidermale Wachstumsfaktor in der Lage, die DNA-Synthese in Hepatozyten der nicht hepatektomierten Leber zu stimulieren (Bucher et al., 1978); diese Stimulierung ist allerdings nicht besonders ausgeprägt. Die Konzentrationen von EGF, die zur Stimulierung der DNA-Synthese kultivierter Hepatozyten führen (0.17-1.7 nM, Richman et al., 1976), liegen im physiologischen Bereich (Bucher et al., 1978; Hilaire & Jones, 1982; Burwen et al., 1985).

Neben EGF kommen noch eine Reihe weiterer Faktoren für die Stimulierung der DNA-Synthese in Kulturen primärer Hepatozyten in Frage. Aus Seren von partiell hepatektomierten Ratten isolierten mehrere Arbeitsgruppen Faktoren, welche die DNA-Synthese von Hepatozyten stimulierten. Die Molekulargewichte dieser Wachstumsfaktoren betrugen bei Morley & Kingdon (1973) 26 kD, bei Michalopoulos et al. (1984) 3 bzw. 120 kD, bei Nakamura et al. (1984b) 150 kD und bei Goldberg (1985) 38 kD. Weiterhin haben Strain et al. (1982), Russel et al. (1984a+b) und Paul & Piasecki (1984) einen Faktor aus Thrombozyten isoliert, der von 'platelet derived growth factor' (PDGF) verschieden ist und ebenfalls die DNA-Synthese in Hepatozytenkulturen stimuliert. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, daß die, in vivo beobachtete, erhöhte Zellproliferation in präneoplastischen Foci durch andere als die verwendeten Hormone ausgelöst wird.

Neben der Induktion der DNA-Replikation bei Hepatozyten durch Stimulatoren, wird auch eine Regulation durch Inhibitoren, die von der Leber selbst produziert werden (Chalone), diskutiert (Holder, 1981). Wird eine kontinuierliche, nicht regulierte Sekretion des Chalons durch die Leberzelle angenommen, so würde eine partielle Hepatektomie zum Absinken der Konzentration des Chalons im Blut und damit zur Aufhebung der Hemmung der DNA-Synthese führen. Mehrere lösliche Inhibitoren wurden isoliert, es ist jedoch noch unklar, welche dieser Substanzen tatsächlich in die Regulation der Zellteilung der Hepatozyten eingreifen (Übersicht siehe Nadal, 1979). Besondere Beachtung verdient ein Faktor, der von McMahon et al. (1982, 1984) aus dem Zytoplasma von Rattenlebern gewonnen wurde und der die Proliferation kultivierter Hepatozyten aus 12 Tage alten Ratten hemmte. Keinen Einfluß hatte dieser Inhibitor dagegen auf das Wachstum maligner Leberzellen. Das veränderte Wachstumsverhalten präneoplastischer Hepatozyten könnte daher auch auf eine reduzierte Empfindlichkeit dieser Zellen gegenüber Wachstumsinhibitoren zurückzuführen sein.

Auch Zell-Zell Kontakte spielen bei der Regulation der DNA-Replikation eine Rolle. Werden Hepatozyten bei hohen Zelldichten kultiviert, so ist die DNA-Synthese reduziert (Nakamura et al., 1983a; Hayashi & Carr, 1984; Nakamura & Ichihara, 1985). Diese Kontaktinhibition kann auch von isolierten hepatischen Zellmembranen (Nakamura et al., 1983b) vermittelt werden, sogar Membranpräparationen zweier Hepatomazelllinien, deren Wachstum von der Zelldichte unabhängig ist, waren in der Lage, die DNA-Synthese kultivierter Hepatozyten zu hemmen (Nakamura et al., 1984a). Dieser Befund zeigt, daß Hepatomazelllinien die inhibitorisch wirkenden Membranbestandteile noch besitzen, die Zellproliferation aber von der Anwesenheit dieser Inhibitoren unabhängig geworden ist. Eine eingeschränkte Proliferationshemmung durch Zell-Zell Kontakte könnte ebenfalls für die erhöhte Zellteilung in präneoplastischen Foci verantwortlich sein.

Zukünftige Untersuchungen, bei denen andere mitogene und mitosehemmende Faktoren eingesetzt werden, sowie Versuche mit Hepatozytenkulturen unterschiedlicher Zelldichte, könnten Aufschluß über die Ursachen der vermehrten Zellteilung präneoplastischer Hepatozyten geben. Ist die gestörte Wachstumskontrolle dieser Zellen auf eine Mutation zurückzuführen, so sollte es möglich sein, Kulturbedingungen zu finden, bei denen diese genetische Änderung auch exprimiert wird.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird ein Verfahren beschrieben, Vorläufer von Tumorzellen - präneoplastische Zellen - aus Lebern von Ratten zu isolieren, die mit einem Leberkanzerogen vorbehandelt wurden. Die Methode basiert auf der Eigenschaft präneoplastischer Hepatozyten, die γ -Glutamyltranspeptidase (γ -GT), die in Hepatozyten adulter Ratten sonst nicht vorkommt, zu exprimieren. Da dieses Enzym auf der äußeren Oberfläche der Zellmembran lokalisiert ist, lassen sich γ -GT positive Hepatozyten selektiv an Anti- γ -GT Antikörper-beschichtete Petrischalen binden.

Aus Rattenlebern wurden Hepatozytensuspensionen durch Kollagenaseperfusion erhalten. Die Anti- γ -GT Antikörper wurden aus dem Serum von Kaninchen isoliert, die mit gereinigter γ -GT aus Rattenmilch immunisiert worden waren. Nach der Beschichtung der Petrischalen mit den Antikörpern erfolgte die Trennung γ -GT positiver und negativer Hepatozyten durch Inkubation der Hepatozytensuspensionen auf den Petrischalen.

Bei der Ausarbeitung der Methodik wurden folgende Ergebnisse erhalten:

1. γ -GT positive Hepatozyten hefteten sich schneller an die beschichteten Petrischalen als γ -GT negative Zellen. Zu kurze Inkubationszeiten führten zu einer geringen Ausbeute gebundener, γ -GT positiver Zellen; bei zu langer Inkubation kam es zu einer zunehmenden Bindung γ -GT negativer Zellen, sodaß die Anreicherung γ -GT positiver Hepatozyten ungenügend war.
2. Die Anheftungsgeschwindigkeit der Hepatozyten nahm mit steigender Temperatur zu. Bei einer Inkubationstemperatur von 25°C lag die optimale Inkubationszeit zwischen 20 und 60 Minuten. Da die Anheftungsgeschwindigkeit von Hepatozyten verschiedener Zellpräparationen unterschiedlich war, mußte

die optimale Inkubationszeit für jedes Experiment gesondert ermittelt werden. Die Anheftungsgeschwindigkeit war abhängig von der Perfusionsdauer der Leber mit Kollagenase und von der verwendeten Kollagenasecharge. Längere Perfusionszeiten führten zum schnelleren Anheften der Hepatozyten an die Petrischalen.

3. Durch Zusatz von DNase zum Inkubationsmedium konnte die unspezifische Zellhaftung reduziert werden.
4. y-GT positive Hepatozyten konnten routinemäßig von ca. 10 auf ca. 70% y-GT positive Zellen angereichert werden. Pro Petrischale betrug die Ausbeute ca. 10^5 Hepatozyten.

y-GT positive und negative Hepatozyten wurden hinsichtlich der Aktivität Fremdstoff-metabolisierender Enzyme, der Taurocholataufnahme sowie der Stimulierbarkeit der DNA-Synthese durch ein Hormongemisch, bestehend aus EGF, Insulin und Glucagon, verglichen.

Folgende Ergebnisse wurden erhalten:

1. Die Aktivitäten Cytochrom P-450 abhängiger Monooxygenasen betrugen in y-GT positiven Hepatozyten 11-30% der Werte y-GT negativer Zellen; dagegen waren die Aktivitäten von UDP-Glucuronosyltransferase und Epoxidhydrolase in y-GT positiven Hepatozyten etwa verdoppelt. Die Änderungen der Aktivitäten dieser Enzyme in präneoplastischen Foci könnten die tumorpromovierende Wirkung von Hepatokanzerogenen, deren Toxizität von metabolischer Aktivierung abhängig ist, erklären.
2. Die Aufnahme von Taurocholat in y-GT positive Hepatozyten war um ca. 50% reduziert. Der partielle Verlust dieser organspezifischen Funktion zeigt, daß bereits frühe Vorstadien von Tumorzellen eine beginnende Dedifferenzierung aufweisen können.

3. Die Stimulation der replikativen DNA-Synthese kultivierter Hepatozyten durch die Hormone EGF, Insulin und Glucagon war in γ -GT positiven und negativen Hepatozyten nicht signifikant verschieden. Die in vivo nachgewiesene, erhöhte Zellproliferation präneoplastischer Hepatozyten kann daher wahrscheinlich nicht auf eine gesteigerte Stimulierbarkeit der DNA-Synthese durch diese Hormone zurückgeführt werden.

7. Literatur

1. Albert, Z., Orlowski, M. & Szewczuk, A. (1961) Histochemical demonstration of γ -glutamyl transpeptidase. *Nature* 4790, 767-777.
2. Åström, A., DePierre, J.W. & Eriksson, L. (1983) Characterization of drug-metabolizing systems in hyperplastic nodules from the livers of rats receiving 2-acetylaminofluorene in their diet. *Carcinogenesis* 4, 577-581.
3. Avrameas, S. & Ternynck, T. (1969) The cross-linking of proteins with glutaraldehyde and its use for the preparation of immunoadsorbents. *Immunochemistry* 6, 53-66.
4. Batt, A.M., Siest, G. & Oesch, F. (1984) Differential regulation of two microsomal epoxide hydrolases in hyperplastic nodules from rat liver. *Carcinogenesis* 5, 1205-1206.
5. Berry, M.N. & Friend, D.S. (1969) High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. A biochemical and fine structural study. *J. Cell Biol.* 43, 506-520.
6. Bissell, D.M. & Guzelian, P.S. (1980) Phenotypic stability of adult rat hepatocytes in primary monolayer culture. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 349, 85-98.
7. Bock, K.W., Lilienblum, W., Pfeil, H. & Eriksson, L.C. (1982) Increased uridine diphosphate-glucuronyltransferase activity in preneoplastic liver nodules and morris hepatomas. *Cancer Res.* 42, 3747-3752.
8. Börner, P. & Gössner, W. (1968) Enzymhistochemische Untersuchungen der Adenosin-Triphosphatase, der alkalischen und sauren Phosphatase sowie der Succinodehydrogenase im Leberparenchym der Ratte während der Einwirkung des Cancerogens Diäthylnitrosamin. *Z. Naturforschg.* 23b, 1085-1091.
9. Bowman, P. & McLaren, A. (1970a) Viability and growth of mouse embryos after in vitro culture and fusion. *J. Embryol. exp. Morphol.* 23, 693-704.
10. Bowman, P. & McLaren, A. (1970b) The reaction of the mouse blastocyst and its zona pellucida to enzymes in vitro. *J. Embryol. exp. Morphol.* 24, 331-334.

11. Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
12. Bucher, N.L.R. & Swaffield, M.N. (1975) Regulation of hepatic regeneration in rats by synergistic action of insulin and glucagon. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72, 1157-1160.
13. Bucher, N.L.R., Patel, U. & Cohen, S. (1978) Hormonal factors and liver growth. *Adv. Enzyme Reg.* 16, 205-213.
14. Buchmann, A., Kuhlmann, W., Schwarz, M., Kunz, W., Wolf, C.R., Moll, E., Friedberg, T. & Oesch, F. (1985) Regulation and expression of four cytochrome P-450 isoenzymes, NADPH-cytochrome P-450 reductase, the glutathione transferases B and C and microsomal epoxide hydrolase in pre-neoplastic and neoplastic lesions in rat liver. *Carcinogenesis* 6, 513-521.
15. Burke, M.D. & Mayer, R.T. (1974) Ethoxyresorufin: Direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug Metab. Disposition* 2, 583-588.
16. Bursch, W., Lauer, B., Timmermann-Trosiener, I., Barthel, G., Schuppler, J. & Schulte-Hermann, R. (1984) Controlled death (apoptosis) of normal and putative preneoplastic cells in rat liver following withdrawal of tumor promoters. *Carcinogenesis* 5, 453-458.
17. Burwen, S.J., Barker, M.E., Goldman, I.S. & Jones, A.L. (1985) The effect of concentration on hepatic transport of exogenous epidermal growth factor. *Hepatology* 5, 211-214.
18. Cayama, E., Tsuda, H., Sarma, D.S.R. & Farber, E. (1978) Initiation of chemical carcinogenesis requires cell proliferation. *Nature* 275, 60-62.
19. Cleaver, J.E. (1969) Repair replication of mammalian cell DNA: effects of compounds that inhibit DNA synthesis or dark repair. *Radiat. Res.* 37, 334-348.
20. Columbano, A., Rajalakshmi, S. & Sarma, D.S.R. (1981) Requirement of cell proliferation for the initiation of liver carcinogenesis as assayed by three different procedures. *Cancer Res.* 41, 2079-2083.
21. Farber, E. (1984a) Cellular biochemistry of the stepwise development of cancer with chemicals: G.H.A. clowes memorial lecture. *Cancer Res.* 44, 5463-5474.

22. Farber, E. (1984b) The biochemistry of preneoplastic liver: a common metabolic pattern in hepatocyte nodules. *Can. J. Biochem. Cell Biol.* 62, 486-494.
23. Fischer, G., Ullrich, D., Katz, N., Bock, K.W. & Schauer, A. (1983) Immunohistochemical and biochemical detection of uridine-diphosphate-glucuronyltransferase (UDP-GT) activity in putative preneoplastic liver foci. *Virchows Arch. B [Cell Pathol.]* 42, 193-200.
24. Fisher, B., Szuch, P., Levine, M. & Fisher, E.R. (1971) A portal blood factor as the humoral agent in liver regeneration. *Science* 171, 575-577.
25. Friedman, D.L., Claus, T.H., Pilgis, S.J. & Pine, G.E. (1981) Hormonal regulation of DNA synthesis in primary cultures of adult rat hepatocytes. Action of glucagon. *Exp. Cell Res.* 135, 283-290.
26. Frimmer, M. (1982) Organotropism by carrier-mediated transport. *Trends Pharmacol. Sci.* 3, 395-397.
27. Gebhardt, R. & Jung, W. (1982) Biliary secretion of sodium fluorescein in primary monolayer cultures of adult rat hepatocytes and its stimulation by nicotinamide. *J. Cell Sci.* 56, 233-244.
28. Gjessing, R. & Seglen, P.O. (1980) Adsorption, simple binding and complex binding of rat hepatocytes to various in vitro substrata. *Exp. Cell Res.* 129, 239-249.
29. Gössner, W. & Friedrich-Frekza, H. (1964) Histochemische Untersuchungen über die Glucose-6-Phosphatase in der Ratteleber während der Kanzerisierung durch Nitrosamine. *Z. Naturforschg.* 19b, 862-863.
30. Goldberg, M. (1985) Purification and partial characterization of a liver cell proliferation factor called hepatopoietin. *J. Cell Biochem.* 27, 291-302.
31. Greim, H., Summer, K.-H. & Schwarz, L.R. (1984) Metabolic inactivation of toxins. In Mechanisms of hepatocyte injury and death. I. Liver - Diseases (Keppler, D., ed.), pp. 369-377, MPT Press, Hingham, USA.
32. Grundmann, E., Petzinger, E., Frimmer, M. & Boschek, C.B. (1978) A possible reason for the phalloidin tolerance of hepatoma cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 305, 253-259.

33. Guengerich, F.P., Dannan, G.A., Wright, S.T., Martin, M.V. & Kaminsky, L.S. (1982) Purification and characterization of liver microsomal cytochromes P-450: Electrophoretic, spectral, catalytic, and immunochemical properties and inducibility of eight isozymes isolated from rats treated with phenobarbital or β -naphthoflavone. *Biochemistry* 21, 6019-6030.
34. Guengerich, F.P. & Liebler, D.C. (1985) Enzymatic activation of chemicals to toxic metabolites. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* 14, 259-307.
35. Guguen-Guillouzo, C. & Guillouzo, A. (1983) Modulation of functional activities in cultured rat hepatocytes. *Mol. Cell. Biochem.* 53/54, 35-56.
36. Hanigan, H.M. & Pitot, H.C. (1982) Isolation of γ -glutamyl transpeptidase positive hepatocytes during the early stages of hepatocarcinogenesis in the rat. *Carcinogenesis*, 3, 1349-1354.
37. Hatton, M.W.C., Berry, L.R., Krestynski, F., Sweeney, G.D. & Regoeczi, E. (1983) The role of proteolytic enzymes derived from crude bacterial collagenase in the liberation of hepatocytes from rat liver. Identification of two cell-liberating mechanisms. *Eur. J. Biochem.* 137, 311-318.
38. Hayashi, I. & Carr, B.I. (1984) Rat hepatocytes in culture. A model for studies of growth control during experimental chemical hepatocarcinogenesis. In *Mammalian cell culture. The use of serum-free hormone-supplemented media* (Mather, J.P., ed.), Plenum Press, New York, London.
39. Hefley, T., Cushing, J. & Brand, J.S. (1981) Enzymatic isolation of cells from bone: cytotoxic enzymes of bacterial collagenase. *Am. J. Physiol.* 240, C234-C238.
40. Hennings, H., Shores, R., Wenk, M.L., Spangler, E.F., Tarone, R. & Yuspa, S.H. (1983) Malignant conversion of mouse skin tumours is increased by tumour initiators and unaffected by tumour promoters. *Nature* 304, 67-69.
41. Hilaire, R.J.St. & Jones, A.L. (1982) Epidermal growth factor: Its biologic and metabolic effects with emphasis on the hepatocyte. *Hepatology* 2, 601-613.
42. Holder, N. (1981) Regeneration and compensatory growth. *Brit. Med. Bull.* 37, 227-232.

43. Horiuchi, S., Inoue, M. & Morino, Y. (1978) γ -glutamyl transpeptidase: Sidedness of its active site on renal brush-border membrane. *Eur. J. Biochem.* 87, 429-437.
44. Hughey, R.P. & Curthoys, N.P. (1976) Comparison of the size and physical properties of γ -glutamyl transpeptidase purified from rat kidney following solubilization with papain or with triton X-100. *J. Biol. Chem.* 251, 7863-7870.
45. Ichihara, A., Nakamura, T. & Tanaka, K. (1982) Use of hepatocytes in primary culture for biochemical studies on liver functions. *Mol. Cell. Biochem.* 43, 145-160.
46. Inoue, H., Hosokawa, K. & Takeda, Y. (1965) Protein and ribonucleic acid syntheses in dispersed rat-liver cells. *Biochim. Biophys. Acta* 103, 127-135.
47. Inoue, M., Horiuchi, S. & Morino, Y. (1977) γ -Glutamyl transpeptidase in rat ascites tumor cell LY-5. *Eur. J. Biochem.* 78, 609-615.
48. Johansson, S., Kjellén, L., Höök, M. & Timpl, R. (1981) Substrate Adhesion of rat hepatocytes: A comparison of laminin and fibronectin as attachment proteins. *J. Cell Biol.* 90, 260-264.
49. Johansson, S. & Höök, M. (1984) Substrate adhesion of rat hepatocytes: on the mechanism of attachment to fibronectin. *J. Cell Biol.* 98, 810-817.
50. Kalengayi, M.M.R., Ronchi, G. & Desmet, V.J. (1975) Histochemistry of γ -glutamyl transpeptidase in rat liver during aflatoxin B₁-induced carcinogenesis. *J. Nat. Cancer Inst.* 55, 579-582.
51. Klingenberg, M. & Pfaff, E. (1967) Means of terminating reactions. *Meth. Enzymol.* 10, 680-684.
52. Kroker, R., Anwer, M.S. & Hegner, D. (1978) The lack of active bile acid transport in AS-30 D Ascites hepatoma cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 303, 299-301.
53. Laemmli, U.K. & Favre, M. (1973) Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA Packaging events. *J. Mol. Biol.* 80, 575-599.
54. Leffert, H.L. & Paul, D. (1972) Studies on primary cultures of differentiated fetal liver cells. *J. Cell Biol.* 52, 559-568.

55. Loofbourow, J.R., Gould, B.S. & Sizer, I.W. (1949) Studies on the ultraviolet absorption spectra of collagen. *Archs. Biochem.* 22, 406-411.
56. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
57. McGowan, J.A., Strain, A.J. & Bucher, N.L.R. (1981) DNA synthesis in primary cultures of adult rat hepatocytes in a defined medium: Effects of epidermal growth factor, insulin, glucagon, and cyclic-AMP. *J. Cell. Physiol.* 108, 353-363.
58. McMahon, J.B., Farrelly, J.G. & Iype, P.T. (1982) Purification and properties of a rat liver protein that specifically inhibits the proliferation of nonmalignant epithelial cells from rat liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 456-460.
59. McMahon, J.B., Malan-Shibley, L. & Iype, P.T. (1984) Distribution and subcellular localization of a hepatic proliferation inhibitor in rat liver. *J. Biol. Chem.* 259, 1803-1806.
60. Meister, A., Tate, S.S. & Griffith, O.W. (1981) γ -glutamyl transpeptidase. *Meth. Enzymol.* 77, 237-253.
61. Michalopoulos, G., Houck, K.A., Dolan, M.L. & Luetkeke, N.C. (1984) Control of hepatocyte replication by two serum factors. *Cancer Res.* 44, 4414-4419.
62. Miller, J.A. & Miller, E.C. (1977) Ultimate chemical carcinogens as reactive mutagenic electrophiles. In *Origins of human cancer* (Hiatt, H.H., Watson, J.D. & Winsten, J.A., eds.), pp. 605-627. Cold Spring Harbor Laboratory.
63. Mochizuki, Y., Furukawa, K. & Sawada, N. (1982) Effects of various concentrations of ethyl-alpha-p-chlorooxyisobutyrate (clofibrate) on diethylnitrosamine-induced hepatic tumorigenesis in the rat. *Carcinogenesis* 3, 1027-1029.
64. Moolten, F.L. & Bucher, N.L.R. (1967) Regeneration of rat liver: Transfer of humoral agent by cross circulation. *Science* 158, 272-274.
65. Morley, C.G.D. & Kingdon, H.S. (1973) The regulation of cell growth. I. Identification and partial characterization of a DNA synthesis stimulating factor from the serum of partially hepatectomized rats. *Biochim. Biophys. Acta* 308, 260-275.

66. Morrissey, B.W. (1977) The adsorption and conformation of plasma proteins: A physical approach. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 283, 50-64.
67. Nadal, C. (1979) Control of liver growth inhibitors (chalones). *Arch. Toxicol., Suppl.* 2, 131-142.
68. Nakamura, T., Tomita, Y. & Ichihara, A. (1983a) Density-dependent growth control of adult rat hepatocytes in primary culture. *J. Biochem.* 94, 1029-1035.
69. Nakamura, T., Yoshimoto, K., Nakayama, Y., Tomita, Y. & Ichihara, A. (1983b) Reciprocal modulation of growth and differentiated functions of mature rat hepatocytes in primary culture by cell-cell contact and cell membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 7229-7233.
70. Nakamura, T., Nakayama, Y., Teramoto, H., Nawa, K. & Ichihara, A. (1984a) Loss of reciprocal modulations of growth and liver function of hepatoma cells in culture by contact with cells or cell membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 6398-6402.
71. Nakamura, T., Nawa, K. & Ichihara, A. (1984b) Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122, 1450-1459.
72. Nakamura, T. & Ichihara, A. (1985) Control of growth and expression of differentiated functions of mature hepatocytes in primary culture. *Cell Struct. Funct.* 10, 1-16.
73. Nebert, D.W. & Gelboin, H.V. (1968) Substrate-inducible microsomal aryl hydroxylase in mammalian cell culture. I. Assay and properties of induced enzyme. *J. Biol. Chem.* 243, 6242-6249.
74. Newman, S.L. & Guzelian, P.S. (1983) Identification of the cyanopregnenolone-inducible form of hepatic cytochrome P-450 as a catalyst of aldrin epoxidation. *Biochem. Pharmacol.* 32, 1529-1531.
75. Oesch, F., Jerina, D.M. & Daly, J. (1971) A radiometric assay for hepatic epoxide hydrolase activity with [7-³H]styrene oxide. *Biochim. Biophys. Acta*, 227, 685-691.
76. Okita, K., Noda, K., Fukumoto, Y. & Takemoto, T. (1976) Cytochrome P-450 in hyperplastic liver nodules during hepatocarcinogenesis with N-2-Fluorenylacetamide in rats. *Gann.* 67, 899-902.

77. Ouchterlony, Ö. (1949) Antigen - antibody reactions in gels. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 26, 507-515.
78. Parsons, G.H. jr. (1981) Antibody-coated plastic tubes in radioimmunoassay. *Meth. Enzymol.* 73, 224-244.
79. Paul, D. & Piasecki, A. (1984) Rat platelets contain growth factor(s) distinct from PDGF which stimulate DNA synthesis in primary adult rat hepatocyte cultures. *Exp. Cell Res.* 154, 95-100.
80. Peraino, C., Fry, R.J.M., Staffeldt, E. & Kisieleski, W.E. (1973) Effects of varying the exposure to phenobarbital on its enhancement of 2-acetylaminofluorene-induced hepatic tumorigenesis in the rat. *Cancer Res.* 33, 2701-2705.
81. Peterson, G.L. (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83, 346-356.
82. Petzinger, E., Burckhardt, G., Schwenk, M. & Faulstich, H. (1982) Lack of intestinal transport of [³H]-demethyl-phalloin: Comparative studies with phallotoxins and bile acids on isolated small intestinal cells and ileal brush border membrane vesicles. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 320, 196-200.
83. Pitot, H.C., Barsness, L., Goldsworthy, T. & Kitagawa, T. (1978) Biochemical characterisation of stages of hepatocarcinogenesis after a single dose of diethylnitrosamine. *Nature* 271, 456-457.
84. Pitot, H.C. & Sirica, A.E. (1980) The stages of initiation and promotion in hepatocarcinogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 605, 191-215.
85. Pohl, R.J. & Fouts, J.R. (1980) A rapid method for assaying the metabolism of 7-ethoxyresorufin by microsomal subcellular fractions. *Anal. Biochem.* 107, 150-155.
86. Potter, V.R. (1983) Alternative hypotheses for the role of promotion in chemical carcinogenesis. *Environ. Health Perspect.* 50, 139-148.
87. Potter, V.R. (1984) Use of two sequential applications of initiators in the production of hepatomas in the rat: An examination of the solt-farber protocol. *Cancer Res.* 44, 2733-2736.

88. Puchinger, H. & Wieland, Th. (1969) Suche nach einem Metaboliten bei Vergiftung mit Desmethylphalloin (DMP). *Europ. J. Biochem.* 11, 1-6.
89. Pugh, T.D. & Goldfarb, S. (1978) Quantitative histochemical and autoradiographic studies of hepatocarcinogenesis in rats fed 2-acetylaminofluorene followed by phenobarbital. *Cancer Res.* 38, 4450-4457.
90. Queral, A.E., DeAngelo, A.B. & Garrett, C.T. (1984) Effect of different collagenases on the isolation of viable hepatocytes from rat liver. *Anal. Biochem.* 138, 235-237.
91. Reddy, J.K. & Rao, M.S. (1978) Enhancement by Wy-14,643, a hepatic peroxisome proliferator, of diethylnitrosamine-initiated hepatic tumorigenesis in the rat. *Br. J. Cancer* 38, 537-543.
92. Richman, R.A., Claus, T.H., Pilakis, S.J. & Friedman, D.L. (1976) Hormonal stimulation of DNA synthesis in primary cultures of adult rat hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 3589-3593.
93. Romeis, B. (1948) *Mikroskopische Technik*, p. 100, R. Oldenbourg, München.
94. Rubin, K., Höök, M., Öbrink, B. & Timpl, R. (1981a) Substrate adhesion of rat hepatocytes: Mechanism of attachment to collagen substrates. *Cell* 24, 463-470.
95. Rubin, K., Johansson, S., Höök, M. & Öbrink, B. (1981b) Substrate adhesion of rat hepatocytes. *Exp. Cell Res.* 135, 127-135.
96. Russell, W.E., McGowan, J.A. & Bucher, N.L.R. (1984a) Partial characterization of a hepatocyte growth factor from rat platelets. *J. Cell. Physiol.* 119, 183-192.
97. Russell, W.E., McGowan, J.A. & Bucher, N.L.R. (1984b) Biological properties of a hepatocyte growth factor from rat platelets. *J. Cell. Physiol.* 119, 193-197.
98. Ryan, D.E., Thomas, P.E., Reik, L.M. & Levin, W. (1982) Purification, characterization and regulation of five rat hepatic microsomal cytochrome P-450 isozymes. *Xenobiotica* 12, 727-744.
99. Sakai, A. (1970) Humoral factor triggering DNA synthesis after partial hepatectomy in the rat. *Nature* 228, 1186-1187.

100. Sand, T.-E., Brønstad, G., Digernes, V., Killi, A., Amara, W., Refsnes, M. & Christoffersen, T. (1985) Quantitative aspects of the effects of insulin, epidermal growth factor and dexamethasone on DNA synthesis in cultured adult rat hepatocytes. *Acta Endocrinol.* 109, 369-377.
101. Sawada, N., Furukawa, K. & Tsukada, H. (1982) In vitro measurement of resistance to phalloidin and γ -glutamyl transferase of carcinogen-induced preneoplastic hepatocytes of rats. *J. Nat. Cancer Inst.* 69, 683-686
102. Scherer, E. (1984) Neoplastic progression in experimental hepatocarcinogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 738, 219-236.
103. Schulte-Hermann, R., Ohde, G., Schuppler, J. & Timmermann-Trosiener, I. (1981) Enhanced proliferation of putative preneoplastic cells in rat liver following treatment with the tumor promoters phenobarbital, hexachlorocyclohexane, steroid compounds, and nafenopin. *Cancer Res.* 41, 2556-2562.
104. Schulte-Hermann, R., Roome, N., Timmermann-Trosiener, I. & Schuppler, J. (1984) Immunocytochemical demonstration of a phenobarbital-inducible cytochrome P-450 in putative preneoplastic foci of rat liver. *Carcinogenesis* 5, 149-153.
105. Schulte-Hermann, R. (1985) Tumor promotion in the liver. *Arch. Toxicol.* 57, 147-158.
106. Schwarz, L.R., Burr, R., Schwenk, M., Pfaff, E. & Greim, H. (1975) Uptake of taurocholic acid into isolated rat-liver cells. *Eur. J. Biochem.* 55, 617-623.
107. Schwarz, L.R., Götz, R. & Klaassen, C.D. (1980). Uptake of sulfobromophthalein-glutathione conjugate by isolated hepatocytes. *Am. J. Physiol.* 239, C118-C123.
108. Schwenk, M., Hegazy, E. & Lopez Del Pino, V. (1983) Kinetics of taurocholate uptake by isolated ileal cells of guinea-pig. *Eur. J. Biochem.* 131, 387-391.
109. Schwenk, M. (1985) Active bile acid transport in isolated ileal cells. In *Enterohepatic circulation of bile acids and steroid metabolism* (Paumgartner, ed.), pp. 109-119. MTP-Press, Lancaster.
110. Seglen, P.O. & Gjessing, R. (1978) Effect of temperature and divalent cations on the substratum attachment of rat hepatocytes in vitro. *J. Cell Sci.* 34, 117-131.

111. Seglen, P.O. & Fossa, J. (1978) Attachment of rat hepatocytes in vitro to substrata of serum protein, collagen, or concanavalin A. *Exp. Cell Res.* 116, 199-206.
112. Singh, J. & Wiebel, F. (1979) A highly sensitive and rapid fluorometric assay for UDP-glucuronyltransferase using 3-hydroxybenzo[a]pyrene as substrate. *Anal. Biochem.* 98, 394-401.
113. Sirica, A.E. & Cihla H.P. (1984) Isolation and partial characterizations of oval and hyperplastic bile ductular cell-enriched populations from the livers of carcinogen and noncarcinogen-treated rats. *Cancer Res.* 44, 3454-3466.
114. Steinberg, M.S. (1963) "ECM": Its nature, origin and function in cell aggregation. *Exp. Cell Res.* 30, 257-279.
115. Stout, D.L., Hemminki, K. & Becker, F.F. (1980) Covalent binding of 2-Acetylaminofluorene, 2-Aminofluorene, and N-Hydroxy-2-acetylaminofluorene to rat liver nuclear DNA and protein in vivo and in vitro. *Cancer Res.* 40, 3579-3584.
116. Strain, A.J., McGowan, J.A. & Bucher, N.L.R. (1982) Stimulation of DNA synthesis in primary cultures of adult rat hepatocytes by rat platelet-associated substance(s). In *Vitro* 18, 108-116.
117. Szasz, G. (1970) γ -Glutamyl Transpeptidase. In *Methoden der enzymatischen Analyse*, Band 1 (Bergmeyer, H.U., ed.), pp. 733-738, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße.
118. Tate, S.S. & Meister, A. (1975) Identity of maleate-stimulated glutaminase with γ -glutamyl transpeptidase in rat kidney. *J. Biol. Chem.* 250, 4619-4627.
119. Thomas, P.S. & Farquhar, M.N. (1978) Specific measurement of DNA in nuclei and nucleic acids using diaminobenzoic acid. *Anal. Biochem.* 89, 35-44.
120. Tomita, Y., Nakamura, T. & Ichihara, A. (1981) Control of DNA synthesis and ornithine decarboxylase activity by hormones and amino acids in primary cultures of adult rat hepatocytes. *Exp. Cell Res.* 135, 363-371.
121. Tsao, M.S., Smith, J.D., Nelson, K.G. & Grisham, J.W. (1984) A diploid epithelial cell line from normal adult rat liver with phenotypic properties of 'oval' cells. *Exp. Cell Res.* 154, 38-52.

122. Tsuchida, S., Hoshino, K., Sato, T., Ito, N. & Sato, K. (1979) Purification of γ -glutamyl transferases from rat hepatomas and hyperplastic hepatic nodules, and comparison with the enzyme from rat kidney. *Cancer Res.* 39, 4200-4205.
123. Voss, B., Allam, S., Rauterberg, J., Ullrich, K., Gieselmann, V. & von Figura, K. (1979) Primary cultures of rat hepatocytes synthesize fibronectin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 90, 1348-1354.
124. Vytasek, R. (1982) A sensitive fluorometric assay for the determination of DNA. *Anal. Biochem.* 120, 243-248.
125. Waxman, D.J., Dannan, G.A. & Guengerich, F.P. (1985) Regulation of rat hepatic cytochrome P-450: Age-dependent expression, hormonal imprinting, and xenobiotic inducibility of sex-specific isoenzymes. *Biochemistry* 24, 4409-4417.
126. Wiebel, F.J., Brown, S., Waters, H.L. & Selkirk, J.K. (1977) Activation of xenobiotics by monooxygenases: Cultures of mammalian cells as analytical tool. *Arch. Toxicol.* 39, 133-148.
127. Wieland, T., Nassal, M., Kramer, W., Fricker, G., Bickel, U. & Kurz, G. (1984) Identity of hepatic membrane transport systems for bile salts, phalloidin, and antamanide by photoaffinity labeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 5232-5236.
128. Wolff, T., Deml, E. & Wanders, H. (1979) Aldrin epoxidation, a highly sensitive indicator specific for cytochrome P-450-dependent mono-oxygenase activities. *Drug Metab. Disp.* 7, 301-305.
129. Wolff, T., Greim, H., Huang, M.-T., Miwa, G.T. & Lu, A.Y.H. (1980) Aldrin epoxidation catalyzed by purified rat-liver cytochromes P-450 and P-448. High selectivity for cytochrome P-450. *Eur. J. Biochem.* 111, 545-551.
130. Wulff, J.C., Tsoi, M.-S., Aprile, J., Deeg, H.J., Durkopp, N. & Storb, R. (1982) Stimulation of canine lymphocyte subpopulations separated nonlytically by monoclonal anti-T and polyclonal anti-B cell antibodies. *Blut* 45, 309-316.
131. Wysocki, L.J. & Sato, V.L. (1978) "Panning" for lymphocytes: A method for cell selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 2844-2848.

132. Yaswen, P., Hayner, N.T. & Fausto, N. (1984) Isolation of oval cells by centrifugal elutriation and comparison with other cell types purified from normal and preneoplastic livers. *Cancer Res.* 44, 324-331.
133. Ziegler, K., Petzinger, E., Grundmann, E. & Frimmer, M. (1979) Decreased sensitivity of isolated hepatocytes from baby rats, from regenerating and from poisoned livers to phalloidin. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 306, 295-300.
134. Ziegler, K., Petzinger, E. & Frimmer, M. (1980) Decreased phalloidin response, phallotoxin uptake and bile acid transport in hepatocytes prepared from Wistar rats treated chronically with diethylnitrosamine. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 310, 245-247.

L E B E N S L A U F

Jörg Lebsanft

geboren am 31. August 1956 in Stuttgart

Vater: Dr. Albert Lebsanft, Jurist

Mutter: Ursula Lebsanft, geb. von der Twer

April 1963 - November 1966	Besuch der Hölderlinschule in Tübingen
Dezember 1966 - Mai 1975	Besuch des Keplergymnasiums in Tübingen
27. Mai 1975	Erwerb der Allgemeinen Hoch- schulreife
Juli 1975 - September 1976	Wehrdienst in Großengstingen
Oktober 1976	Beginn des Biochemiestudiums an der Universität Tübingen
5. Oktober 1977	1. Teil der Diplomvorprüfung
26. September 1979	2. Teil der Diplomvorprüfung
Juli 1982	mündliche Diplomhauptprüfung
September 1982 - Juli 1983	Diplomarbeit bei Prof. Dr. H.P.T. Ammon am Lehrstuhl für Pharmakologie am Pharmazeu- tischen Institut in Tübingen
September 1983	Beginn der Dissertation bei Prof. Dr. H. Greim im Institut für Toxikologie der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung München
5. bis 31. Oktober 1984	Teilnahme am Kurs Mutagenese und Kancerogenese der Sektion Toxiko- logie der Deutschen Pharmakolo- gischen Gesellschaft

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 1983 bis Januar 1986 durchgeführt. Herrn Prof. Dr. H. Greim danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die immer gern gewährte Unterstützung während dieser Arbeit. Herrn Dr. L.R. Schwarz danke ich für das große Interesse und die ständige Diskussionsbereitschaft.

Der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung danke ich für die Förderung durch ein Stipendium.

